



Joana Isabel Freitas Saraiva

Licenciada em Bioquímica

**Interação da proteína efetora VipA
de *Legionella pneumophila* com componentes
da via endocítica da célula hospedeira**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Genética Molecular e Biomedicina

Orientador: Irina Franco, Doutora, Faculdade de Ciências e Tecnologia da
Universidade Nova de Lisboa (FCT/UNL)

Coorientador: Jaime Mota, Professor Auxiliar, Faculdade de Ciências e
Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa (FCT/UNL)

Novembro 2020



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA



Joana Isabel Freitas Saraiva

Licenciada em Bioquímica

**Interação da proteína efetora VipA
de *Legionella pneumophila* com componentes
da via endocítica da célula hospedeira**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Genética Molecular e Biomedicina

Orientador: Irina Franco, Doutora, Faculdade de Ciências e Tecnologia da
Universidade Nova de Lisboa (FCT/UNL)

Coorientador: Jaime Mota, Professor Auxiliar, Faculdade de Ciências e
Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa (FCT/UNL)

Novembro 2020

Interação da proteína efetora VipA de *Legionella pneumophila* com componentes da via endocítica da célula hospedeira

Copyright © Joana Isabel Freitas Saraiva, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Todo o processo de aprendizagem é um caminho interativo que só se torna realidade com o apoio e motivação de outros, professores, colegas, amigos e família. Assim, a todas as pessoas e instituições que, direta ou indiretamente, contribuíram para a finalização de mais uma jornada da minha vida, o meu mais sincero agradecimento.

Agradeço à instituição da FCT pela oportunidade de aprendizagem essencial no meu processo de formação ao longo destes anos.

Aos meus orientadores Jaime Mota e Irina Franco que me deram a oportunidade de trabalhar neste projeto de investigação, cuja realização permitiu desenvolver uma maior capacidade de perseverança, de paciência e a não desistir.

À Doutora Irina, por tanto me ter ensinado, pelo rigor científico, pelas críticas construtivas, por tirar todas as minhas dúvidas e esclarecer tudo o que me era desconhecido, pela paciência, pela motivação e pelo apoio incondicional durante toda a execução deste projeto de investigação.

Ao Professor Jaime pela disponibilidade, pela partilha dos seus conhecimentos e rigor científico, pelo interesse e orientação durante a realização deste projeto, pela sua paciência, consideração, apoio e motivação.

Às minhas colegas do laboratório de Biologia de Infecção, Maria Cunha, Joana Bugalhão, Inês Pereira e Maria Pequito, que me receberam de braços abertos, sempre disponíveis para me ajudar, partilhar o seu conhecimento e oferecer o seu *input* ao longo deste trabalho. Gostaria também de agradecer à Carolina com quem partilhei esta jornada, as minhas dificuldades e sucessos.

Aos meus amigos, pela compreensão, pelo apoio e pelas palavras de motivação.

À minha família, pelo apoio e incentivo, que embora longe estão sempre presentes na minha vida.

Um obrigada enorme aos meus pais, sem os quais nada disto seria possível. Por me estimularem e me incentivarem nos momentos mais difíceis. Ao meu pai, pelo apoio e sorrisos. À minha mãe pela paciência infinita, por me motivar e nunca me deixar desistir, sem a qual eu não conseguiria finalizar esta tese.

“Nothing in life is to be feared, it is only to be understood. Now is the time to understand more, so that we may fear less.”

— Marie Curie

“It does not matter how slowly you go as long as you do not stop.”

—Confúcio

Resumo

Legionella pneumophila é o agente etiológico da Doença dos Legionários. Esta bactéria tem a capacidade de sobreviver no interior de protozoários e de infectar macrófagos humanos, recorrendo a um sistema de secreção responsável pela translocação de mais de 300 proteínas efetoras para o hospedeiro. VipA, um destes efetores, foi identificada como um nucleador de actina, capaz de interferir com o tráfego membranar em levedura, e de interagir com a proteína Rab5 associada à via endocítica.

No sentido de explorar a interação entre VipA e Rab5, este trabalho teve como objetivos determinar a influência de Rab5 na polimerização de actina mediada por VipA, averiguar a interação VipA-Rab5 em contexto de infeção e estudar a interação de estirpes relevantes de *L. pneumophila* com a via endocítica. Foram efetuados ensaios: de actina-pireno *in vitro*; de translocação; de quantificação da co-localização de estirpes de *L. pneumophila* com endossomas precoces e lisossomas; e de replicação intracelular em macrófagos.

Os ensaios de actina-pireno demonstraram que a interação de VipA com Rab5 na sua forma ativa resulta numa inibição parcial da polimerização de actina mediada por VipA. Em microscopia de fluorescência, foi verificada uma maior associação de mutantes *dotA* com endossomas precoces e lisossomas comparativamente às outras estirpes estudadas. Nos mutantes *vipA*, foi demonstrado um efeito de complementação aquando da sobreexpressão de VipA, traduzida pela diminuição da percentagem de vacúolos EEA1-positivos. Os ensaios de replicação em macrófagos confirmaram uma menor viabilidade do mutante *dotA*, contrariamente às estirpes WT e mutante *vipA*. Finalmente, não foi possível retirar conclusões relativamente à interação VipA-Rab5 em contexto de infeção, dado que os resultados foram inconclusivos.

Em suma, os resultados sugerem um papel de VipA na evasão da via endocítica, possivelmente através da sua interação com Rab5, contribuindo para a sua sobrevivência no hospedeiro.

Palavras-chave: *L. pneumophila*; VipA; nucleador; actina; Rab5; via endocítica

Abstract

Legionella pneumophila is the etiologic agent of Legionnaires' Disease. This bacterium has the capacity of surviving inside protozoa and infecting human macrophages, by using a secretion system that translocates more than 300 effector proteins to the host, essential to bacterium pathogenicity. The effector VipA has been identified as an actin nucleator, capable of interfering with membrane trafficking in yeast and interacting with Rab5, a eukaryotic GTPase associated with the endocytic pathway.

This study aimed to determine the effect of Rab5 on the VipA-mediated actin polymerization, to analyze the interaction of VipA-Rab5 in an infection context and to study the interaction of relevant strains of *L. pneumophila* with the endocytic pathway. For this purpose, in vitro pyrene-actin assays, translocation assays, quantification of the co-localization of *L. pneumophila* strains with early endosomes and lysosomes, and intracellular replication assays in macrophages were performed.

The pyrene-actin assays showed that the interaction of Rab5 in its active form with VipA results in a partial inhibition of the actin polymerization mediated by the latter. In fluorescence microscopy, significant differences were found between the *dotA* mutants and the other strains studied, manifested by a greater association of *dotA* mutants with early endosomes and lysosomes. Regarding the *vipA* mutants, a complementation effect was established when VipA was overexpressed, resulting in significant differences in terms of the percentage of EEA1-positive vacuoles. In intracellular replication assays, *dotA* mutants presented lower viability, in contrast to the WT strain and the *vipA* mutant strain. Finally, no conclusions could be drawn from the VipA-Rab5 interaction in infected cells, as the results were inconclusive.

In summary, these results point to a function of VipA in the evasion of the endocytic pathway, possibly through its interaction with Rab5, enabling bacterial survival within the host cell.

Keywords: *L. pneumophila*; VipA; nucleator; actin; Rab5; endocytic pathway

Índice de Matérias

Agradecimentos	v
Resumo	vii
Abstract	ix
Índice de Matérias	xi
Índice de Figuras	xiii
Índice de Tabelas	xix
Lista de Abreviaturas e Acrónimos	xxi
1. Introdução.....	1
1.1. <i>Legionella pneumophila</i>	1
1.2. Ciclo celular de <i>L. pneumophila</i>	2
1.3. Vias de tráfego membranar e Rab GTPases	3
1.3.1. Via endocítica.....	4
1.3.2. Modulação da via endocítica por microrganismos patogénicos	6
1.3.3. Via secretória	8
1.4. O citoesqueleto de actina	10
1.5. Sistema de secreção do tipo IVB (T4SSB) e proteínas efetoras.....	11
1.6. Proteína efetora VipA	15
1.7. Interação da proteína efetora VipA com a proteína eucariótica GTPásica Rab5	16
1.8. Objetivos	17
2. Materiais e Métodos	19
2.1. Crescimento bacteriano	19
2.2. Sobreexpressão e purificação por cromatografia de afinidade das proteínas His ₆ -VipA, GST-Rab5 e respetivas variantes.....	19
2.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)	21
2.4. Immunoblotting	22
2.5. Quantificação de proteínas pelo Método de Bradford	22
2.6. Ensaio de actina-pireno <i>in vitro</i>	23
2.7. Cultura de tecidos e infeção com <i>L. pneumophila</i>	24
2.8. Imunofluorescência e Microscopia de Fluorescência	25
2.9. Construção do plasmídeo pJS1	25
2.10. Preparação de células competentes de <i>E. coli</i> (NEB 10-β).....	26
2.11. Transformação de células competentes de <i>E. coli</i> (NEB 10-β)	26
2.12. Colony PCR.....	27
2.13. Transformação em <i>L. pneumophila</i>	27
2.14. Preparação de stock de LPJS1.....	27

2.15. Preparação de extrato celular de LPJS1 para <i>immunoblotting</i>	27
2.16. Ensaios de translocação para o citosol de macrófagos	28
2.17. Ensaios de unidades formadoras de colónias (UFCs)	29
3. Resultados	30
3.1. Efeito da Rab5 na polimerização de actina mediada por VipA	30
3.1.1. Purificação das proteínas His ₆ -VipA, GST-Rab5 e respectivas variantes	30
3.1.2. Ensaios de actina-pireno <i>in vitro</i>	33
3.1.2.1. GST-Rab5 ^{CA} inibe a polimerização de actina mediada pela His ₆ -VipA	34
3.2. Interação VipA-Rab5 em contexto de infeção em macrófagos.....	38
3.2.1. 3xFLAG-VipA co-localiza com Rab5 eucariótica endógena	39
3.2.2. Ensaios de translocação de 4xHA-VipA para o citosol de macrófagos.....	40
3.3. Localização de P _{tac} -3xFLAG-VipA e P _{vipA} -4xHA-VipA em macrófagos	44
3.3.1. Construção do plasmídeo pJS1 e formação da estirpe LPJS1	44
3.3.2. A proteína translocada 3xFLAG-VipA expressa a partir do promotor P _{tac} apresenta uma localização citoplasmática e co-localiza com actina	44
3.4 Interação de diferentes estirpes de <i>L. pneumophila</i> com a via endocítica	47
3.5. Unidades formadoras de colónias (UFCs).....	54
4. Discussão	57
5. Bibliografia	62
Anexos	65

Índice de Figuras

Figura 1.1 - Representação esquemática das vias secretória e endocítica. As vesículas revestidas de COPI e COPII estão representadas por círculos vermelhos e azuis, respectivamente. As vesículas de transporte revestidas por clatrina estão representadas por pentágonos roxos. Transportes anterógrado e retrógrado estão representados por setas pretas. ER, retículo endoplasmático; PM, membrana plasmática; ERGIC, complexo intermediário vesicular RE-Golgi. Imagem retirada de M. Kousi (2012)^[20]..... 3

Figura 1.2 - Ciclo das Rab GTPases. As Rab GTPases têm duas formas principais, uma forma inativa (“off”) ligada a GDP (guanosina difosfato) e uma forma ativa (“on”) ligada a GTP (guanosina trifosfato). A proteína Rab recentemente sintetizada liga-se a uma proteína REP (*Rab escort protein*), permitindo a prenilação no C-terminal da GTPase essencial à localização desta proteína no interior da membrana das células eucarióticas (A). Subsequentemente, a Rab é entregue à membrana alvo (A), onde é ativada pela ação de uma proteína GEF (*Guanine nucleotide exchange factor*), responsável pela troca GDP/GTP (B), iniciando o ciclo de ativação. Uma vez ativada, a Rab GTPase interage com uma variedade de proteínas efetoras (C), modulando o tráfego celular. A passagem para o estado inativo ocorre através da presença de uma proteína GAP (*GTPase activating protein*) (D), responsável pela hidrólise do GTP a GDP. Finalmente, a Rab GTPase é extraída da membrana através da ação de uma proteína GDI (*GDP dissociation inhibitor*) (E), que se liga à forma inativa da Rab e inibe a troca de GDP por GTP. O recrutamento de novo da Rab GTPase para a membrana resulta na dissociação da Rab inativa do GDI através do fator proteico GDF (*GDI displacement factor*), recomeçando assim um novo ciclo. Criado através de BioRender. Adaptado de Stenmark, Harald M Olkkonen, Vesa. (2011)^[26]..... 5

Figura 1.3 - Ciclo de vida intracelular de *Legionella pneumophila*. O início do ciclo compreende a entrada da bactéria num macrófago ou numa amíeba através de fagocitose (A). Após a sua entrada na célula, *L. pneumophila* localiza-se no interior de um vacúolo denominado de *Legionella containig vacuole* (LCV) (B), através do qual evita a via endocítica e, por isso, a fusão com endossomas precoces e endossomas tardios (B), bem como posterior fusão com o lisossoma (C). O LCV, dentro da primeira hora, interage com mitocôndrias como também com vesículas derivadas do RE destinadas ao complexo de Golgi, interferindo assim com a via secretória (C). Isto leva à formação de um vacúolo especializado, permissivo à sobrevivência da bactéria e replicação da mesma (D). Após várias rondas de replicação, a bactéria torna-se flagelada e abandona a célula hospedeira de forma a iniciar um novo ciclo de infecção (E-F). EP, endossoma precoce; ET, endossoma tardio; RE, retículo endoplasmático. Criado através de BioRender. Adaptado de Franco I. S. *et al.*^[16]..... 8

Figura 1.4 – Sistema de secreção do tipo IVB de *L. pneumophila*. O complexo central putativo constituído por DotC, DotD, DotH, DotG e DotF foi sugerido por Vincent *et al.* (2006). Um possível cenário para a sua associação é o seguinte: (1) as proteínas DotC e DotD da membrana externa recrutam a proteína intrínseca periplasmática DotH, formando o complexo DotC-DotD-DotH; (2) o domínio C-terminal de DotG participa no complexo, resultando num complexo que se estende através das membranas interna e externa; e (3) DotF participa no complexo central ao ligar DotG e/ou o complexo DotC-DotD-DotH. Imagem retirada de H. Nagai *et al.*^[40]..... 12

Figura 1.5 – *L. pneumophila* modula diferentes vias do hospedeiro através de vários fatores de virulência. Os efetores de *L. pneumophila* têm como alvos processos como (a partir do canto superior esquerdo, na direção dos ponteiros do relógio): o tráfego membranar, através da interação com GTPases, os fosfoinosítídeos membranares, a síntese proteica e a maquinaria de resposta ao stress, a apoptose

celular e as vias de ubiquitinação do hospedeiro. Círculos grandes correspondem a vesículas com origem no Retículo Endoplasmático. Imagem retirada de Newton H. J. *et al.*^[41] 13

Figura 1.6 - Biogénese do LCV através de modificações pós-traducionais da GTPase Rab1 por *L. pneumophila*. O recrutamento de vesículas com origem no RE para o LCV é orquestrado através de um conjunto de efetores translocados através do sistema de secreção do tipo IVB (T4BSS). SidM é responsável pela dissociação entre Rab1 e GDI, através da sua atividade de GEF. SidM, subsequentemente, através de AMPilação, bloqueia Rab1 na forma GTP-Rab1, permitindo o recrutamento de vesículas RE para a superfície do LCV. SidD remove o grupo AMP resultante da reação de AMPilação, permitindo a atividade de GAPs como o LepB. A atividade deste último resulta na remoção de Rab1 do LCV. AnkX, por sua vez, induz uma reação de fosfocolinação, apresentando um efeito semelhante ao da reação de AMPilação. Lem3, contrariamente, é responsável pela remoção do grupo de fosfocolina de Rab1. ER, Retículo endoplasmático; GTP, guanosina trifosfato; GDP, guanosina difosfato; GDI, inibidor de dissociação GDP. Imagem retirada de C. Michard *et al.*^[42] 14

Figura 1.7 – Representação da estrutura primária da proteína VipA. NH₂, extremidade N-terminal. CC, *coiled coil*. COOH, extremidade C-terminal. NPY, motivo asparagina-prolina-tirosina. Pro, sequência rica em prolinas. Imagem retirada de Bugalhão *et al.*^[44] 15

Figura 1.8 - VipA, uma proteína efetora de *Legionella pneumophila*, interage com Rab5, uma pequena proteína GTPásica eucariótica. Células de mamífero foram transfectadas com plasmídeos que codificam as proteínas VipA-myc e diferentes formas de Rab5. (A) A co-localização entre VipA-myc e as formas de EGFP-Rab5 (EGFP-Rab5^{WT} e EGFP-Rab5^{CA}) foi observada por microscopia. Após fixação, a marcação foi realizada através do uso de anticorpos contra myc. Imagens apresentadas foram recolhidas num microscópio Zeiss Axiolmager D2. (B) A precipitação de GFP-Rab5 foi feita através de anticorpos contra GFP, e a interação com VipA^{WT}-myc e VipA^{ΔNH2}-myc foi observada através de um *immunoblot*, recorrendo aos anticorpos anti-myc e anti-GFP 17

Figura 3.1 - Imagem representativa das sequências das proteínas His₆-VipA, GST-Rab5 e respetivas variantes usadas neste trabalho. (A) His₆-VipA^{WT} e His₆-VipA^{ΔNH2} (aa134-aa339) foram sobreexpressas em *E. coli* BL21 (DE3) e purificadas através de cromatografia de afinidade usando colunas de Ni²⁺-NTA. (B) GST-Rab5^{WT}, GST-Rab5^{CA} (Q79L) e GST-Rab5^{DN} (S34N) foram sobreexpressas em *E. coli* BL21 (DE3) e purificadas através de cromatografia de afinidade usando colunas de glutationa sefarose..... 30

Figura 3.2 - SDS-PAGE das frações obtidas na purificação das proteínas (A) His₆-VipA^{WT} e (B) His₆-VipA^{ΔNH2}. Purificação das proteínas por cromatografia de afinidade através de uma coluna de Ni²⁺-NTA. MM, Massa Molecular; M, Marcador de pesos moleculares; SN, sobrenadante; FT, *flowthrough*; W1-2, lavagens 1 e 2; 1 a 5, eluições com 100 e 200 mM de imidazole. Bandas correspondentes a His₆-VipA^{WT} (40 kDa) e His₆-VipA^{ΔNH2} (24 kDa) encontram-se assinaladas..... 31

Figura 3.3 - SDS-PAGE das frações obtidas na purificação das proteínas (A) GST-Rab5^{WT}, (B) GST-Rab5^{CA} e (C) GST-Rab5^{DN}. Purificação das proteínas por cromatografia de afinidade através de uma coluna de glutationa sefarose. MM, Massa Molecular; M, Marcador de pesos moleculares; SN, sobrenadante; FT, *flowthrough*; W1-3, lavagens 1 e 3; 1 a 5, eluições com 10 mM de glutationa. Bandas correspondentes a GST-Rab5^{WT}, GST-Rab5^{CA} e GST-Rab5^{DN} (50 kDa) encontram-se assinaladas..... 32

Figura 3.4 - GST-Rab5^{CA} inibe a polimerização de actina mediada por His₆-VipA. Ensaios de polimerização de actina, *in vitro*, foram realizados na presença de 2,4 μ M de actina monomérica (20% de pireno-actina) e His₆-VipA^{WT}, His₆-VipA ^{Δ NH₂} e GST-Rab5^{CA}. Os valores de fluorescência (expressos em Unidades Arbitrárias, U.A.) foram recolhidos a 407 nm após a excitação a 365 nm e medidos após a indução de polimerização (a $t = 5$ min). Em (A) e (B) as amostras foram pré-incubadas com 500 nM de His₆-VipA^{WT} e His₆-VipA ^{Δ NH₂}, respetivamente, e com 500 nM de GST-Rab5^{CA}. Curvas correspondem à média de 6 ensaios independentes (A) ou 3 ensaios independentes (B). Barras de erro representam o erro padrão da média..... 35

Figura 3.5 – Interferência de GST-Rab5^{WT} e GST-Rab5^{DN} na polimerização de actina mediada por His₆-VipA. Ensaios de polimerização de actina *in vitro* foram realizados na presença de 2,4 μ M de actina monomérica (20% de pireno-actina) e His₆-VipA^{WT}, GST-Rab5^{WT} e GST-Rab5^{DN}. Os valores de fluorescência (expressos em Unidades Arbitrárias, U.A.) foram recolhidos a 407 nm após a excitação a 365 nm e medidos após a indução de polimerização (a $t = 5$ min). Em (A) e (B) as amostras foram pré-incubadas com 500 nM de His₆-VipA^{WT} e com 500 nM da GST-Rab5^{DN} ou GST-Rab5^{WT}, respetivamente. Curvas correspondem à média de 3 ensaios independentes em (A) e (B). As intensidades de fluorescência foram normalizadas pelo valor obtido aquando da subtração da média dos primeiros 5 valores de intensidade de fluorescência da actina pela média dos primeiros 5 valores de intensidade obtidos aquando da adição de cada proteína. Barras de erro representam o erro padrão da média..... 37

Figura 3.6 – Co-localização de 3xFLAG-VipA com Rab5 endógena em macrófagos. Células THP-1 foram infetadas com estirpes de *L. pneumophila* que sobreexpressam 3xFLAG-VipA, sendo uma proficiente na sua secreção (LPIF159) e a outra deficiente (mutante *dotA*, LPIF160), com uma MOI de 500, e posteriormente fixadas com 4% PFA, a um tempo após-infecção (TPI) de 2h. A proteína VipA está ligada a uma cauda de 3xFLAG, permitindo a sua deteção com um anticorpo primário anti-FLAG e um secundário ligado ao fluoróforo Alexa Fluor 594 anti-ratinho (a vermelho). A proteína Rab5 encontra-se marcada com o anticorpo anti-Rab5 e correspondente anticorpo secundário anti-cabra ligado ao fluoróforo Alexa Fluor 488 (a verde). Os núcleos e as bactérias foram marcados com o fluoróforo DAPI. À direita, as imagens Merge apresentam a sobreposição dos canais correspondentes a VipA e Rab5. Os locais onde é observada co-localização estão assinalados com setas brancas. As imagens apresentadas são imagens representativas e foram recolhidas através de um microscópio Zeiss AxioImager D2. Barras de escala, 8 μ m..... 40

Figura 3.7 - A proteína controlo GFP permanece no sobrenadante. Células THP-1 foram infetadas com estirpes de *L. pneumophila* cujo gene *vipA* foi deletado, sobreexpressando 4xHA-VipA e GFP (LPIF145) ou apenas GFP (LPIF146), com uma MOI de 100, durante 2 horas. As células infetadas foram lisadas através da incubação com um tampão com (A) 0,1% de NP-40, (B) 0,1% ou 0,05% do detergente NP-40 ou com (C) 0,1% ou 0,05% de Triton-X. Análise por *immunoblot* com o anticorpo anti-GFP e respetivo anticorpo secundário conjugado a HRP. MM, Massa Molecular; P, *pellet*; SN, sobrenadante. 41

Figura 3.8 - Esquema representativo da diluição seriada realizada aquando da incubação de bactérias em tampões de lise com diferentes constituições. O total de $1,5 \times 10^8$ bactérias usadas nos ensaios de translocação foram incubadas, durante 10 minutos, com tampões de lise de diferentes constituições, realizando-se subsequentemente uma diluição seriada. Foram transferidos 100 μ L do tubo correspondente à diluição 10^0 , onde as bactérias foram inicialmente inoculadas, para o tubo da diluição 10^{-1} , no qual foi efetuada a adição prévia de 900 μ L de dH₂O. Após homogeneização, foram transferidos 100 μ L do tubo correspondente à diluição 10^{-1} para o tubo 10^{-2} . Este processo foi repetido até à diluição 10^{-6} 42

Figura 3.9 - Localização da P_{tac} -3xFLAG-VipA e P_{vipA} -4xHA-VipA em macrófagos e co-localização com F-actina. Macrófagos foram infectados com as estirpes de *L. pneumophila*: LPIF03 cujo gene *vipA* foi deletado; LPIF159 que sobreexpressa 3xFLAG-VipA sob o controle do promotor tac (P_{tac}); e LPJS1 que sobreexpressa 4xHA-VipA sob o controle do promotor natural da bactéria (P_{vipA}). Foi utilizada uma MOI de 500 e as células infectadas foram fixadas com 4% PFA, a diferentes tempos após-infecção (2, 4, 6 e 8h). A proteína VipA (a verde) foi marcada através do anticorpo primário anti-FLAG, e correspondente anticorpo secundário, anti-ratinho ligado ao fluoróforo Alexa Fluor 488 (LPIF03; LPIF159); ou do anticorpo anti-HA, seguido do anticorpo secundário anti-ratazana ligado ao fluoróforo Alexa Fluor 488 (LPJS1). Os filamentos de actina (a vermelho) foram marcadas através da faloidina conjugada ao fluoróforo Alexa Fluor 594. As bactérias e os núcleos (a azul) foram marcados através de DAPI. O primeiro canal de Merge apresenta apenas os canais correspondentes à VipA e F-actina. O segundo canal de Merge corresponde à convergência de todos os canais. As imagens apresentadas são imagens representativas, recolhidas num microscópio Zeiss Axiolmager D2. Barras de escala, 8 μ m. 46

Figura 3.10 – Co-localização do LCV de diferentes estirpes de *L. pneumophila* com endossomas precoces. Macrófagos foram infectados com diferentes estirpes de *L. pneumophila*, a forma WT, o mutante *dotA* ($\Delta dotA$), o mutante *vipA* ($\Delta vipA$), a P_{tac} -3xFLAG-VipA e a P_{vipA} -4xHA-VipA. A infecção foi realizada com uma MOI de 250 e as células infectadas foram fixadas com 4% PFA, a diferentes tempos após-infecção (5, 15, 30 e 45 minutos). As estirpes de *L. pneumophila* (a vermelho) foram marcadas com o anticorpo anti-Lp conjugado com a rodamina (anti-Lp-Rho). Os endossomas precoces (a verde) foram marcados através do anticorpo anti-EEA1, e correspondente anticorpo secundário, anti-ratinho conjugado com o fluoróforo Alexa Fluor 488. As imagens apresentadas são imagens representativas, recolhidas num microscópio Zeiss Axiolmager D2. Barras de escala, 8 μ m. 48

Figura 3.11 - Análise quantitativa da co-localização do LCV de diferentes estirpes de *L. pneumophila* com endossomas precoces, a diferentes tempos após-infecção (TPI). Macrófagos foram infectados com várias estirpes de *L. pneumophila*: WT; estirpes onde o gene $\Delta dotA$ ou o gene $\Delta vipA$ foram deletados; e estirpes que sobreexpressam VipA, P_{tac} -3xFLAG-VipA e P_{vipA} -4xHA-VipA. A infecção foi efetuada com uma MOI de 250 (ou 500 num dos ensaios a 30 minutos) e as células infectadas foram fixadas a diferentes tempos após-infecção (5, 15, 30 e 45 minutos). Para cada condição (estirpe e TPI) foram analisadas, em cada ensaio independente, 54 bactérias, sendo os valores apresentados a média total de vacúolos EEA1-positivos, em percentagem (%). Para o tempo de 5 e 15 minutos foram realizados um total de 3 e 4 ensaios independentes por estirpe, respetivamente. Para os 30 minutos foram realizados 5 ensaios independentes para todas as estirpes, exceto para LPJS1 (n = 3). Para os 45 minutos foram realizados 3 ensaios independentes para todas as estirpes, exceto para LPJS1 (n = 2). Em (A) apresentam-se as percentagens de vacúolos EEA1-positivos nos diferentes TPIs. Em (B) apresenta-se a análise estatística entre estirpes nos diferentes tempos após-infecção, que foi realizada através de *one-way* ANOVA com o teste de Tukey para comparações múltiplas. Diferenças significativas representadas por * (p<0,05), ** (p<0,01). Barras de erro representam o erro padrão da média. 50

Figura 3.12 - Co-localização do LCV de diferentes estirpes de *L. pneumophila* com lisossomas. Macrófagos foram infectados com diferentes estirpes de *L. pneumophila*, a forma WT, o mutante *dotA* ($\Delta dotA$), o mutante *vipA* ($\Delta vipA$), a P_{tac} -3xFLAG-VipA e a P_{vipA} -4xHA-VipA. A infecção foi realizada com uma MOI de 250 e as células infectadas foram fixadas com 4% PFA, a diferentes tempos após-infecção (30 min, 90 min, 4 horas). As estirpes de *L. pneumophila* (a vermelho) foram marcadas com o anticorpo anti-Lp conjugado com a rodamina (anti-Lp-Rho). Os lisossomas (a verde) foram marcados através do anticorpo anti-LAMP-1, e correspondente anticorpo secundário, anti-ratinho conjugado com

o fluoróforo Alexa Fluor 488. As imagens apresentadas são imagens representativas, recolhidas num microscópico Zeiss Axiolmager D2. Barras de escala, 8 μ m. 51

Figura 3.13 - Análise quantitativa da co-localização do LCV de diferentes estirpes de *L. pneumophila* com lisossomas, a diferentes tempos após-infeção (TPI). Macrófagos foram infectados com várias estirpes de *L. pneumophila*: WT; estirpes onde o gene $\Delta dotA$ ou o gene $\Delta vipA$ foram deletados; estirpes que sobreexpressam VipA, P_{tac}-3xFLAG-VipA e P_{vipA}-4xHA-VipA. A infeção foi efetuada com uma MOI de 250 (e 500 num dos ensaios realizados aos 30 minutos) e as células infectadas foram fixadas com 4% PFA, a diferentes tempos após-infeção (30 min, 90 min, 4 h). Para cada condição (estirpe e TPI) foram analisadas, em cada ensaio independente, 54 bactérias, sendo os valores apresentados a média total de vacúolos LAMP-1-positivos, em percentagem (%). Para o tempo de 30 minutos, foram realizados um total de 3 ensaios independentes por estirpe. Para os 90 minutos, foram realizados 2 ensaios independentes para todas as estirpes, exceto para LPJS1. Para as 4h, foram realizados 3 ensaios independentes para todas as estirpes, exceto para LPJS1 (n = 1). Em (A) apresentam-se as percentagens de vacúolos LAMP-1-positivos nos diferentes TPIs. Em (B) apresenta-se a análise estatística entre estirpes nos diferentes tempos após-infeção, que foi realizada através de *one-way* ANOVA com o teste de Tukey para comparações múltiplas. Diferenças significativas representadas por * (p<0,05), ** (p<0,01). Barras de erro representam o erro padrão da média. 53

Figura 3.14 – Multiplicação das diferentes estirpes de *L. pneumophila* ao longo do tempo. Macrófagos foram infectados (MOI de 50) com as estirpes WT e mutante *dotA* e *vipA* e incubados com gentamicina. Após 0, 24 e 48 horas as células foram lisadas e um conjunto de diluições seriadas realizadas, sendo plaqueadas as diluições apropriadas. O número de colónias foi enumerado. 56

Figura A1- Ensaio de Bradford para quantificação total de proteína. A concentração de proteína foi calculada através da construção de uma reta de calibração e subsequente determinação da equação de reta. 69

Figura A2 – Ensaio de Bradford para quantificação total de actina e pireno-actina. A concentração de proteína foi calculada através da construção de uma reta de calibração e subsequente determinação da equação de reta. 69

Figura A3 - Fórmula para o cálculo do erro padrão da média (SEM). n indica o número de ensaios realizados. 70

Figura A4 – His₆-VipA^{WT} exacerba a polimerização de actina. Ensaio de polimerização de actina, *in vitro*, foram realizados na presença de 2,4 μ M de actina monomérica (20% de pireno-actina) e His₆-VipA^{WT} a diferentes concentrações (100, 250 e 500 nM). Os valores de fluorescência (expressos em Unidades Arbitrárias, U.A.) foram recolhidos a 407 nm após a excitação a 365 nm e medidos após a indução de polimerização (a *t* = 5 min). As curvas apresentadas são imagens representativas. 70

Figura A5 - Expressão de 4xHA-VipA (42,6 kDa) na estirpe LPJS1. 750 μ L da cultura da estirpe LPJS1 foram centrifugados, e o *pellet* recolhido, ressuspendido em 100 μ L de SDS LB e congelado a -20 °C. A análise foi realizada por *immunoblot* através do anticorpo primário anti-HA e respetivo anticorpo secundário conjugado a HRP. MM, massa molecular. 70

Figura A6 - Construção do plasmídeo pJS1 (P_{vipA}-4xHA-VipA). (A) Amplificação do promotor natural de *L. pneumophila* que controla a expressão de VipA, a partir da estirpe JR32 (WT), recorrendo aos *primers forward* 2674 e *reverse* 2675. O produto de PCR foi corrido em gel de agarose 1%, 100 V, durante 25 minutos. (B) As reações de digestão do promotor amplificado e do plasmídeo pIF377 foram realizadas recorrendo às enzimas MluI e EcoRI, sendo o produto de cada digestão purificado e corrido em gel de agarose 1%, durante 15 minutos a 100 V. (C) *Colony* PCR de 24 colónias escolhidas ao acaso de forma a seleccionar clones positivos. Os produtos PCR, de cada colónia, foram corridos em gel agarose 1%, durante 15 minutos a 100 V. O clone 3, seleccionado para propagação, encontra-se marcado com um retângulo. Bandas correspondentes ao (A) promotor amplificado (171 pb), e (B) ao plasmídeo pIF377 (10000 pb) e promotor (151 pb) digeridos, encontram-se assinaladas com setas. 71

Índice de Tabelas

Tabela 2.1 – Estirpes de <i>E. coli</i> e <i>L. pneumophila</i> utilizadas neste trabalho.	20
Tabela 3.1 – Número de colónias da estirpe LPIF145 (4xHA-VipA GFP) obtidas aquando da incubação com o tampão de lise, ou seja, tampão Co-IP na presença de (A) 0,05% de Triton-X e na presença de (B) 10% de glicerol com 0,05% de NP-40 ou 0,05% de saponina.....	43
Tabela 3.2 - Unidades formadoras de colónias obtidas nos diferentes TPIs (0, 24 e 48 horas) e no <i>stock</i> correspondente a cada estirpe.....	55
Tabela A1– Composição das soluções/reagentes usados neste trabalho.....	65

Lista de Abreviaturas e Acrónimos

ABP	– Proteína que liga actina (<i>Actin binding protein</i>)
ADP	– Adenosina difosfato (<i>Adenosine diphosphate</i>)
ATP	– Adenosina trifosfato (<i>Adenosine triphosphate</i>)
AYE	– <i>ACES buffer Yeast Extract</i>
BCV	– <i>Bacterium-containing vacuole</i>
BSA	– Albumina de soro de bovino (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
CA	– Constitutivamente ativa (<i>Constitutive active</i>)
Co-IP	– Co-imunoprecipitação (<i>Co-Immunoprecipitation</i>)
COPI	– Complexo proteico de revestimento 1 (<i>Coat Protein Complex 1</i>)
COPII	– Complexo proteico de revestimento 2 (<i>Coat Protein Complex 2</i>)
CYE	– <i>Charcoal-Yeast Extract Agar</i>
DN	– Dominante negativo (<i>Dominant negative</i>)
Dot/Icm	– <i>Defective organelle trafficking/Intracellular multiplication</i>
DTT	– Ditionitrito (<i>Dithiothreitol</i>)
EE	– Endossomas precoces (<i>Early Endosomes</i>)
EEA1	– Proteína do antígeno de endossomas precoces 1 (<i>Early endosome antigen 1 protein</i>)
ERGIC	– Compartimento vesicular intermediário RE-Golgi (<i>ER-Golgi intermediate compartment</i>)
GAP	– Proteína de ativação de GTPase (<i>GTPase activating protein</i>)
GDF	– Fator de dissociação de GDI (<i>GDI displacement factor</i>)
GDI	– Inibidor de dissociação de GDP (<i>GDP dissociation inhibitor</i>)
GDP	– Guanosina difosfato (<i>Guanosine diphosphate</i>)
GEF	– Fator de troca do nucleótido de guanina (<i>Guanine nucleotide exchange factor</i>)
GGTase II	– Rab geranilgeranil transferase 2 (<i>Geranylgeranyltransferase-II</i>)
GST	– Glutathione-S-transferase (<i>Glutathione-S-transferase</i>)
GTP	– Guanosina trifosfato (<i>Guanosine triphosphate</i>)
GTP γ S	– GTP gama S (<i>GTP gamma S</i>)
HRP	– <i>Horseradish peroxidase</i>
ILV	– Vesículas intraluminais (<i>intraluminal vesicles</i>)
IMAC	– <i>Immobilized metal affinity chromatography</i>
IPTG	– Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo (<i>Isopropyl β-D-thiogalactoside</i>)
LAMP-1	– Proteína lisossomal associada à membrana 1 (<i>Lysosomal associated membrane protein 1</i>)
LB	– <i>Loading buffer</i>

LCV – *Legionella containing vacuole*

LE – Endossomas tardios (*Late Endosomes*)

LLO – Listeriolisina O (*Listeriolysin O*)

MOI(s) – Multiplicidade(s) de infecção

MVBs – Corpos multivesiculares (*Multivesicular bodies*)

NPFs – Fatores que promovem a nucleação (*Nucleation promoting factors*)

O/N – Durante a noite (*Over-night*)

PFA – Paraformaldeído (*Paraformaldehyde*)

PI – Inibidor de protease (*Protease inhibitor*)

PMA - Forbol 12-miristato 13-acetato (*Phorbol myristate acetate*)

PMSF - Fluoreto de fenilmetilsulfonil (*phenylmethylsulfonyl fluoride*)

Rab - *Ras-like proteins in brain*

RE – Retículo endoplasmático

RILP – Proteína lisossomal que interage com Rab7 (*Rab7-Interacting Lysosomal Protein*)

SCV – *Salmonella containing vacuole*

SNARES – *Soluble N-ethylmaleinimide-sensitive factor attachment receptor*

SOC - *Super Optimal broth with Catabolite repression*

TGN – Rede *trans* do Golgi (*trans-Golgi network*)

WHO – Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization*)

WT – *Wild-type*

1. Introdução

1.1. *Legionella pneumophila*

Legionella foi identificada por Brenner *et al.* (1978), aquando de um surto de pneumonia atípica que ocorreu na 58ª Convenção da Legião Americana num hotel em Filadélfia em 1976. Este novo agente etiológico foi designado de *Legionella pneumophila* e a patologia de Doença dos Legionários^{[1][2]}. Todavia, em termos patológicos destacam-se duas entidades clínicas resultantes da infeção por *L. pneumophila*, a Febre de Pontiac, uma síndrome febril autolimitada, e a Doença dos Legionários, uma pneumonia atípica com eventual falência multisistémica^{[3][4]}.

A Febre de Pontiac apresenta-se com um quadro abrupto de mau estar, febre, astenia, mialgias, cefaleias, tosse, náuseas e odinofagia em 80-90% dos doentes^[3]. Uma pequena percentagem de doentes apresenta sintomas neurológicos tais como insónia, confusão mental ou falta de concentração. O período de incubação varia entre as 5h e 48h e os doentes recuperam só com tratamento sintomático ao fim de 2 a 5 dias^[4].

A Doença dos Legionários, cuja manifestação clínica primária é a pneumonia^[5], tem um período de incubação que varia entre 2 a 10 dias^[3]. O sintoma universal é a febre e o quadro sintomático pode variar entre uma ligeira sintomatologia respiratória a uma infiltração pulmonar grave com falência multiorgânica. Os sintomas mais comuns são os respiratórios, que incluem tosse, dispneia e dor pleurítica, apresentando apenas 10 a 20% dos pacientes sintomas gastrointestinais (dor abdominal, náuseas, vómitos)^[3]. Mais, 20-25% dos indivíduos infetados apresentam diarreia. Os sintomas neurológicos, como a confusão mental, cefaleias e letargia, são os menos frequentes^[3]. A transmissão desta doença pode ocorrer através de distintos modos, nomeadamente de aerossolização, aspiração, ou mesmo através da inalação direta para os pulmões aquando da manipulação associada ao trato respiratório^[3], sendo este último relacionado com cuidados em meio hospitalar. Em termos epidemiológicos, e de acordo com a WHO (*World Health Organization*), são detetados 10 a 15 casos associados a esta patologia por milhão de população (Europa, USA, Austrália) e, 75 a 80% dos casos reportados têm mais de 50 anos e estão associados essencialmente a homens (60-70%)^[6]. A taxa de mortalidade associada a esta doença varia consoante um conjunto de fatores de risco, apresentando uma maior suscetibilidade a esta patologia indivíduos com >50 anos de idade, fumadores e com outras comorbidades, como doença pulmonar grave, doentes transplantados, doenças oncológicas, diabetes e indivíduos imunosuprimidos^{[3][7]}. Tendo isto em conta, a taxa de mortalidade atinge um valor de 80% entre doentes imunosuprimidos, aquando da ausência de antibioterapia apropriada. Contrariamente, e aquando da administração adequada de tratamento, nos indivíduos imunocompetentes, as percentagens de mortalidade variam entre 0 a 11%, podendo atingir valores de mortalidade até 31% na ausência de tratamento^[3].

L. pneumophila pertence à família *Legionellaceae* que é composta por um único género^[1]. O género *Legionella* engloba 65 espécies dentro das quais, a espécie *L. pneumophila* é responsável por 80 a 90% dos casos de doença em humanos, na Europa e nos Estados Unidos^[8]. Esta espécie encontra-se dividida em 15 serogrupos, sendo os serogrupos 1, 4 e 6 mais comumente implicados nas infeções em humanos^[3]. Destaca-se, no entanto, o serogrupo 1 como a variante de maior prevalência em pacientes infetados com *L. pneumophila*^{[5][9]}. Os agentes patogénicos que constituem este género são bactérias pleomórficas, de coloração de Gram negativa, aeróbicas, com forma de bacilo, apresentando valores de largura e comprimento que variam entre 0,3 e 0,9 µm e 2 a 20 µm, respetivamente^[10]. *Legionella spp.* são ubíquas na natureza em ecossistemas aquáticos de água doce e solos, apresentando a capacidade de sobreviver e replicar no interior de protozoários, nomeadamente de amibas como *Acanthamoeba castellanii*, *Hartmannella spp.* e *Naegleria spp.*^[8]. Estes organismos patogénicos conseguem ainda sobreviver extracelularmente no ambiente associados a biofilmes^[11]. Adicionalmente, foi verificada a presença deste agente bacteriano em torres de refrigeração, sistemas de água quente e fria, e água encontrada em jacuzzis^[12]. Mais, um estudo efetuado por uma equipa de investigadores de Coimbra com foco em águas hidrotermais constatou a presença de várias espécies de *Legionella*, que apresentavam a capacidade de sobreviver a temperaturas entre 0 e 68 °C e a valores de pH entre 5,0 a 8,5^[13].

1.2. Ciclo celular de *L. pneumophila*

L. pneumophila apresenta a capacidade de infetar também outras células eucarióticas para além de amibas, nomeadamente células humanas do sistema imunitário. Pensa-se que esta capacidade de infetar estas células provém da aquisição de características de virulência aquando da infeção de protozoários aquáticos, ao longo da evolução^[14]. Estas características de virulência incluem a presença de fatores proteicos adquiridos, potencialmente, através de um fenómeno de transferência horizontal de genes presentes nas amibas (o seu hospedeiro eucarionte), que apresentam paralelismo com proteínas eucarióticas (*eukaryotic-like proteins*)^[8]. De facto, a inalação de aerossóis contaminados e consequente transporte até aos alvéolos pulmonares resulta na infeção de células pulmonares humanas, particularmente macrófagos. Tal qual como o observado nas amibas, estas bactérias em macrófagos apresentam um ciclo de vida bifásico, alternando entre duas formas: uma forma transmissiva (virulenta) e uma forma replicativa (não virulenta)^{[8][15]}. A forma que a bactéria adota no momento é estabelecida de acordo com as condições do ambiente. Logo, se a bactéria se encontrar no interior do hospedeiro, e por isso num ambiente rico em nutrientes, a forma replicativa predomina, causando uma alteração na expressão genética que inclui a expressão dos genes necessários à replicação e multiplicação intracelular, através da modulação dos processos celulares do hospedeiro, e repressão da expressão de traços transmissivos^[8]. O esgotamento dos recursos leva à alteração da expressão genética de *L. pneumophila* para a forma transmissiva, que inclui a expressão de traços como a mobilidade, resistência

osmótica e acídica e citotoxicidade^[8], obtendo a bactéria a capacidade de invadir uma nova célula hospedeira^[15].

O ciclo de vida intracelular da *L. pneumophila* inicia-se após o contacto da bactéria com a célula hospedeira, resultando na secreção e consequente transporte de proteínas bacterianas (denominadas de “efetores”) para o interior do macrófago através do sistema de secreção Dot/Icm do tipo IVB^[16] (ver abaixo). O transporte destas proteínas para o interior da célula hospedeira permite à bactéria modular o citoesqueleto do hospedeiro, fenómenos de morte celular, processo de internalização, bem como as vias de tráfego membranar (via endocítica; via secretória) através de mecanismos distintos, promovendo assim a sua sobrevivência^[16]. Neste trabalho, o foco do nosso estudo foi a manipulação da via endocítica e a formação dos microfilamentos de actina por parte de *L. pneumophila*. Assim, iremos descrever daqui para a frente o processo sequencial associado à via endocítica, bem como a dinâmica da associação dos filamentos de actina, constituintes do citoesqueleto.

1.3. Vias de tráfego membranar e Rab GTPases

O tráfego membranar corresponde ao fluxo de material, nomeadamente de proteínas e outras macromoléculas, entre compartimentos endomembranares e/ou com a membrana plasmática^{[17][18]}. Este tráfego é realizado através de diferentes vias, incluindo a via endocítica e a via secretória (**Figura 1.1**), sendo o transporte efetuado através de vesículas, cuja mobilidade depende de proteínas motoras (p.e. cinesina, dineína). As vesículas podem diferir no tipo de revestimento (p.e. complexo COPI, complexo COPII, dependentes ou independentes de clatrina) que apresentam e na “carga” que transportam^{[17][18][19]}. Uma vez na membrana alvo, os próximos passos incluem a ancoragem das vesículas, o *docking* e a fusão das mesmas com o alvo.

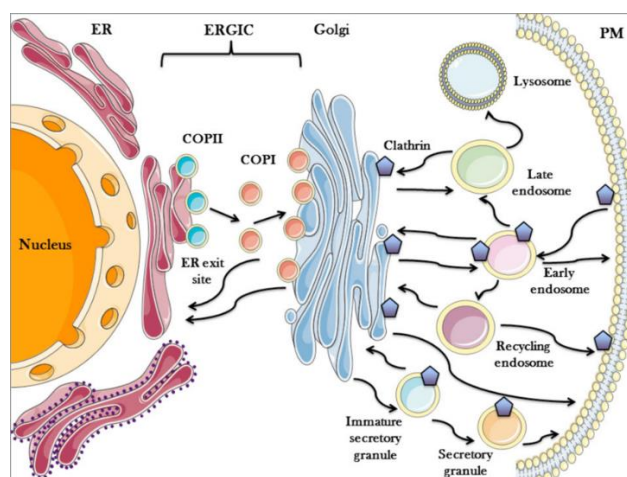


Figura 1.1 - Representação esquemática das vias secretória e endocítica. As vesículas revestidas de COPI e COPII estão representadas por círculos vermelhos e azuis, respetivamente. As vesículas de transporte revestidas por clatrina estão representadas por pentágonos roxos. Transportes anterógrado e retrógrado estão representados por setas pretas. ER, retículo endoplasmático; PM, membrana plasmática; ERGIC, complexo intermediário vesicular RE-Golgi. Imagem retirada de M. Kousi (2012)^[20].

1.3.1. Via endocítica

A via endocítica tem início com a endocitose, processo fundamental à homeostase celular, à interação entre o meio extracelular e intracelular e aos mecanismos de defesa celular^[21]. A endocitose, por sua vez, consiste numa alteração morfológica localizada da membrana plasmática seguido da entrada de macromoléculas, proteínas recetoras e/ou microrganismos na célula hospedeira. Em células de mamífero, consoante o tipo e o tamanho da partícula a ser internalizada e o mecanismo de internalização, destacam-se diferentes vias de internalização endocítica: a via dependente de clatrina, a via mediada por caveolina, a via independente de caveolina e clatrina, a macropinocitose e a fagocitose^[21]. Independentemente do método de entrada, uma vez dentro da célula hospedeira, as moléculas extracelulares localizam-se no interior de vacúolos com origem na membrana plasmática que convergem num único organelo, o endossoma^[21]. Esta estrutura dinâmica túbulo-vesicular apresenta propriedades específicas, sendo responsável pela triagem do material de origem extracelular, encaminhando-o para dois possíveis destinos: degradação através da eventual fusão com os lisossomas; ou reciclagem para a membrana plasmática ou para o complexo de Golgi^[21].

A via endocítica, com destino à degradação, consiste numa sequência de processos de fusão e fissão bem como de alterações morfológicas e biológicas dos endossomas, resultando na fusão final com os lisossomas e consequente degradação. De facto, os endossomas são estruturas transientes e com características distintas^[22], que sofrem um processo de maturação (de endossomas precoces a endossomas tardios), que inclui modificações ao longo da via, nomeadamente nos marcadores de compartimentos (p.e. Rab GTPases), no valor de pH, na formação de vesículas intraluminais (ILV) e na morfologia.

As Rab (*Ras-like proteins in brain*) GTPases são proteínas que fazem parte da superfamília Ras, sendo codificadas por um conjunto de 66 genes no genoma humano^[23]. Estas proteínas têm como principal função modular o tráfego membranar, estando envolvidas em todo o processo do transporte vesicular através do estabelecimento de interações espaciais e temporais com os seus efetores^[23], que incluem, por exemplo, proteínas motoras (p.e. cinesina e dineína, que medeiam a mobilidade de vesículas) e fatores de ancoragem (que promovem a aproximação das membranas para posterior fusão). A localização de Rabs distintas nas membranas de diferentes compartimentos atribui a chamada identidade membranar, conferindo às vias reguladas por estas GTPases especificidade e direccionalidade^[24] e, garantindo assim, que o transporte da carga (moléculas e recetores) para o compartimento correto é assegurado. Exemplos desta localização específica incluem a Rab5, localizada nos endossomas precoces, a Rab7, localizada nos endossomas tardios, Rab2 no transporte de vesículas entre o retículo endoplasmático (RE) e o complexo de Golgi, entre outros^[25]. Como referido acima, as Rab GTPases interferem ao longo de todo o tráfego vesicular, apresentando funções no transporte membranar, na triagem do material a transportar, na produção de vesículas de transporte funcionais, na mobilidade ao longo do citoesqueleto, na ancoragem membranar e nos processos de fusão^[25]. O ciclo de ativação das

proteínas Rab (**Figura 1.2**) transita entre um estado ativo ligado a GTP e um estado inativo ligado a GDP. O estado catalítico destas proteínas é controlado por fatores proteicos, GEFs (*Guanine nucleotide exchange factor*) e GAPs (*GTPase activating protein*), encarregues da aceleração da reação de troca de GDP/GTP e da reação de hidrólise de GTP, respetivamente^[23]. O ciclo tem início com o recrutamento da GTPase à membrana do compartimento específico através da sua proteína GEF, responsável pela alteração da conformação da região *switch 1*, da coordenação com o íon de magnésio (Mg^{2+}), bem como da estabilização da GTPase Rab na sua forma livre de nucleótido, facilitando a dissociação do GDP e a ligação de GTP^[23]. A associação da GTPase à membrana resulta de uma alteração pós-traducional em aminoácidos de cisteína com um ou dois grupos lipofílicos geranilgeranil, localizados na região ou nas proximidades do C-terminal^[24], mediada pela Rab geranilgeranil transferase (GGTase II). Seguida da associação à membrana e posterior ativação da Rab e, após a modificação da conformação, esta interage com os seus efetores ou seja, com as proteínas que interagem especificamente com a forma “on”, efetuando as suas funções^[24]. A Rab GTPase é posteriormente inativada pela sua GAP e dissociada da membrana recorrendo à proteína GDI (*GDP dissociation inhibitor*) que mantém a Rab no seu estado inativo ligado a GDP, no citosol^[24]. O recrutamento de novo para a membrana compartimental e a dissociação da GDI realizada pela GDF (*GDI displacement factor*) recomeça o ciclo de ativação.

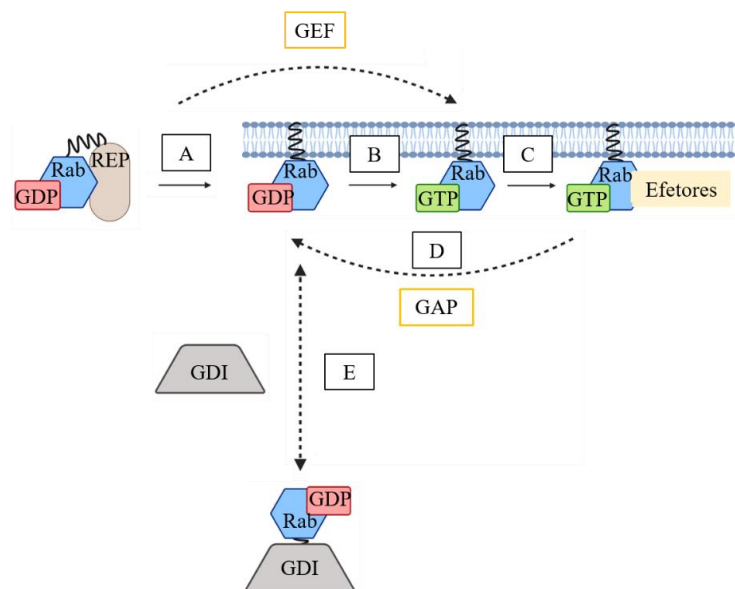


Figura 1.2 - Ciclo das Rab GTPases. As Rab GTPases têm duas formas principais, uma forma inativa (“off”) ligada a GDP (guanosina difosfato) e uma forma ativa (“on”) ligada a GTP (guanosina trifosfato). A proteína Rab recentemente sintetizada liga-se a uma proteína REP (*Rab escort protein*), permitindo a prenilação no C-terminal da GTPase essencial à localização desta proteína no interior da membrana das células eucarióticas (A). Subsequentemente, a Rab é entregue à membrana alvo (A), onde é ativada pela ação de uma proteína GEF (*Guanine nucleotide exchange factor*), responsável pela troca GDP/GTP (B), iniciando o ciclo de ativação. Uma vez ativada, a Rab GTPase interage com uma variedade de proteínas efetoras (C), modulando o tráfego celular. A passagem para o estado inativo ocorre através da presença de uma proteína GAP (*GTPase activating protein*) (D), responsável pela hidrólise do GTP a GDP. Finalmente, a Rab GTPase é extraída da membrana através da ação de uma proteína GDI (*GDP dissociation inhibitor*) (E), que se liga à forma inativa da Rab e inibe a troca de GDP por GTP. O recrutamento de novo da Rab GTPase para a membrana resulta na dissociação da Rab inativa do GDI através do fator proteico GDF (*GDI displacement factor*), recomeçando assim um novo ciclo. Criado através de BioRender. Adaptado de Stenmark, Harald M Olkkonen, Vesa. (2011)^[26].

O processo de maturação tem início nos endossomas precoces (*Early endosomes* – EE) através da fusão deste organelo com o material extracelular, sendo este considerado o organelo principal na triagem da carga extracelular. Estes são distinguidos pela presença de marcadores como a Rab5 e EEA1 (*Early endosome antigen 1 protein*) e pelo seu pH luminal ácido entre 6,2-6,8^[21], resultante de uma bomba de prótons dependente de ATP (v-ATP) localizada na sua membrana^[22]. O processo de fusão com o material de origem extracelular é regulado pela proteína GTPásica Rab5 que, por sua vez, é recrutada para a membrana endossomal e ativada pela sua proteína GEF, a Rabex-5^[27]. Paralelamente, a GTPase induz a presença da proteína efetora Rabaptina-5 que interage com Rabex-5, com quem forma um complexo, promovendo a atividade da GEF e criando assim um *loop de feedback* positivo e consequente aumento da concentração da Rab5 nos EE^[27]. Isto, possibilita o recrutamento rápido de outras proteínas efetoras características dos EE, nomeadamente a proteína de ancoragem EEA1 e a proteína fosfatidilinositol-3-cinase (PIPK3), Vps34. Esta última aumenta a concentração local de fosfatidilinositol-3-fosfato (PtdInd(3)P), um componente aparentemente essencial no mecanismo de maturação^[27]. A formação das ILV é também uma propriedade característica do processo de maturação, iniciando-se neste organelo e formando os chamados corpos multivesiculares (MVBs), que subsequentemente se fundem aos endossomas tardios (*Late endosomes* - LE)^[27].

A transformação dos EE para LE ocorre através da troca de Rab5 por Rab7, com consequente inativação da Rab5 e remoção desta da membrana endossomal. De facto, o modelo que explica esta troca é o designado modelo “*cutoff switch*” que sugere que Rab5 recruta Rab7 para os EE e que esta última apresenta a capacidade de autoativação e suprime a Rab5^[27]. Adicionalmente, um conjunto de estudos realizados em 2010, em *Caenorhabditis elegans* e levedura, demonstraram a presença de potenciais componentes chave nesta troca, SAND-1/Mon1 e Ccz1, indicando que SAND-1/Mon1 ou os dois componentes complexados, podem interagir com Rab5-GTP, PtdInd(3)P, recrutar Rab7 e remover Rabex-5 da membrana endossomal^[27]. Este complexo poderia, portanto, contribuir para a inativação de Rab5 e ativação de Rab7, e consequente formação dos LE.

Tal qual aos EE, os LE apresentam componentes membranares próprios, nomeadamente Rab7 e respetivas proteínas efetoras (p.e. RILP), pH luminal mais ácido que o encontrado nos EE e uma alteração de morfologia, adotando uma forma mais redonda e oval. Finalmente e, aquando destas modificações e aquisição dos componentes mencionados acima, os LE tornam-se propícios à fusão com os lisossomas, resultando na degradação da carga extracelular através de enzimas hidrolíticas^{[22][27]}.

1.3.2. Modulação da via endocítica por microrganismos patogénicos

Existem diferentes estratégias de modulação da via endocítica usadas por diferentes agentes etiológicos intracelulares, aquando da entrada na célula hospedeira. *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*), por exemplo, secreta uma citolisina formadora de poros designada de listeriolisina O (LLO) que,

juntamente com outras fosfolipases, permite lisar o vacúolo que envolve a bactéria e o escape da mesma para o citoplasma^{[28][29]}. Outras bactérias procuram sobreviver no interior do vacúolo recorrendo a diferentes mecanismos para atingir este objetivo. A sobrevivência da *Salmonella enterica* (*S. enterica*) inclui a fusão do vacúolo envolvente da bactéria com os endossomas precoces e tardios e consequente acidificação, impedindo a fusão com o lisossoma^[28]. *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), por outro lado, inibe a maturação do endossoma precoce que a envolve para endossoma tardio e consequente fusão com os lisossomas^[28], evitando assim a sua degradação. De forma semelhante, *L. pneumophila* apresenta esta capacidade de modulação da via endocítica.

A entrada de *L. pneumophila* na célula hospedeira ocorre através do processo de fagocitose (macropinocitose ou *coiling* fagocitose), resultando na localização da bactéria no interior de um vacúolo que se torna especializado, denominado de *Legionella containing vacuole* (LCV) (**Figura 1.3 A e B**)^[16]. Este microrganismo evita a via endocítica através da modificação do LCV, minutos após a sua internalização^[30]. Pondera-se que esta aptidão de evasão a esta via reflita o perfil de RE obtido pelo LCV aquando do recrutamento e interação com vesículas provenientes deste organelo, incluindo ainda a sua interação e subsequente *docking* com mitocôndrias^[31] (**Figura 1.3 C**). De facto, a presença do LCV na imediação dos locais de saída do RE^[8] parece contribuir para a capacidade desta bactéria em sequestrar o tráfego destas vesículas de RE direccionadas ao complexo de Golgi (via secretória). Adicionalmente, estudos de microscopia eletrónica demonstraram a presença de proteínas características do RE (glucose-6-fosfatase; proteína dissulfeto isomerase) no lúmen de LCV, indicando a ocorrência de fusão com o conteúdo solúvel deste organelo celular^[32]. A modificação do LCV resulta então na formação de um vacúolo permissivo à sobrevivência de *L. pneumophila* e subsequente iniciação de múltiplos ciclos de replicação do microrganismo (**Figura 1.3 D**). Assim, o LCV protege a bactéria de ser identificada pelo sistema imunitário do hospedeiro, providenciando também nutrientes para a sua replicação^[30]. Aquando da privação de nutrientes, a forma transmissiva é favorecida resultando no início de um novo ciclo de infeção após a saída das bactérias flageladas da célula e disseminação das mesmas para novas células hospedeiras (**Figura 1.3 E e F**)^[8].

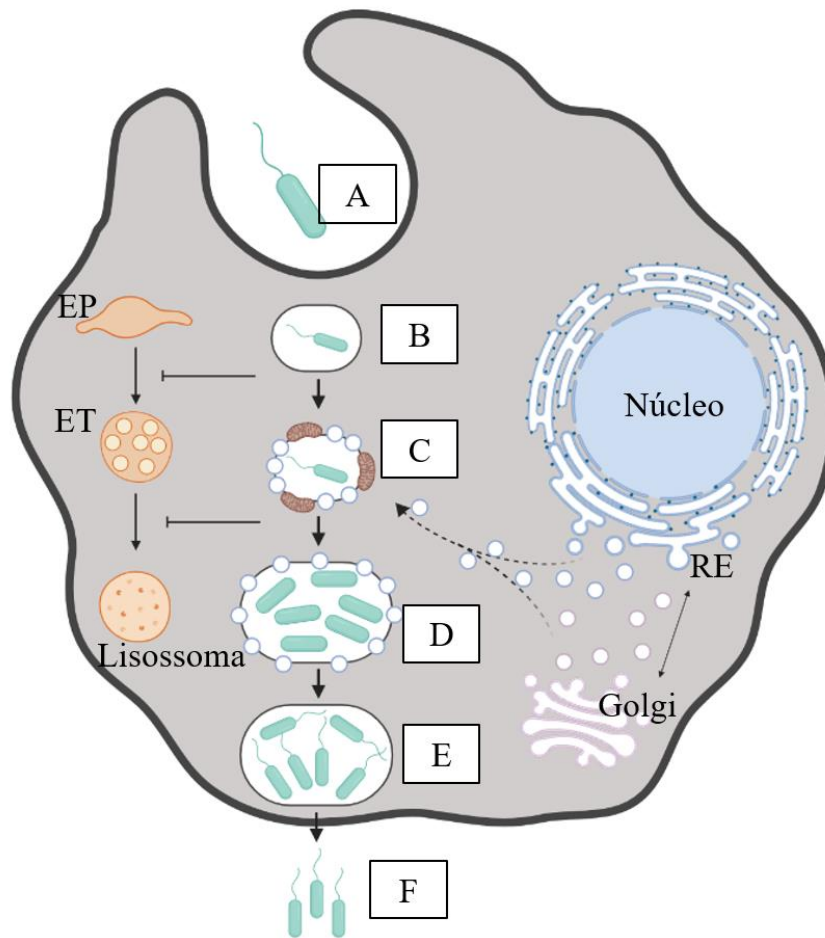


Figura 1.3 - Ciclo de vida intracelular de *Legionella pneumophila*. O início do ciclo compreende a entrada da bactéria num macrófago ou numa ameba através de fagocitose (A). Após a sua entrada na célula, *L. pneumophila* localiza-se no interior de um vacúolo denominado de *Legionella containig vacuole* (LCV) (B), através do qual evita a via endocítica e, por isso, a fusão com endossomas precoces e endossomas tardios (B), bem como posterior fusão com o lisossoma (C). O LCV, dentro da primeira hora, interage com mitocôndrias como também com vesículas derivadas do RE destinadas ao complexo de Golgi, interferindo assim com a via secretória (C). Isto leva à formação de um vacúolo especializado, permissivo à sobrevivência da bactéria e replicação da mesma (D). Após várias rondas de replicação, a bactéria torna-se flagelada e abandona a célula hospedeira de forma a iniciar um novo ciclo de infecção (E-F). EP, endossoma precoce; ET, endossoma tardio; RE, retículo endoplasmático. Criado através de BioRender. Adaptado de Franco I. S. *et al.*^[16].

1.3.3. Via secretória

A via secretória é responsável pela síntese de lípidos e novas proteínas, pelo *folding* de proteínas, e pelo transporte destas macromoléculas para o meio extracelular ou para um organelo específico^[33]. As proteínas sintetizadas nos ribossomas associados ao RE têm dois destinos: o citosol; ou o lúmen do RE. A entrada para o lúmen do RE é efetuada através de um poro especializado (poro de translocação Sec61), aquando do reconhecimento da sequência sinal. Uma vez no lúmen deste organelo, estas proteínas são transportadas para o complexo de Golgi a partir de vesículas sintetizadas através do complexo de COPII e da GTPase Sar1, nos locais de saída do RE^[19]. Pensa-se que esta passagem seja efetuada através de uma estrutura intermediária denominada compartimento vesicular intermediário RE-Golgi (*ER-Golgi intermediate compartment* – ERGIC), que resulta da fusão das vesículas que se formam e destacam dos

locais de saída do RE. Foram sugeridos a presença de domínios nas subunidades de COPII, responsáveis pelo reconhecimento de carga específica, bem como, pelo recrutamento para as vesículas de RE de proteínas SNARES (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment receptor*), como a Sec22^[19]. Estas últimas promovem a fusão membrana-membrana e/ou vesícula-membrana, encontrando-se na membrana dadora (v/R-SNARE) e na membrana recetora (t/Q-SNARE), e cuja diversidade, dependência de Rab e interações com parceiros específicos contribui para a especificidade do tráfego membranar^[18].

O transporte anterógrado do ERGIC apresenta continuidade aquando da fusão com o complexo de Golgi. A passagem pelo complexo de Golgi compreende o transporte do *cis*-Golgi até ao *trans*-Golgi, implicando a alteração limitada das proteínas (proteólise e/ou glicosilação) aquando da exposição às enzimas presentes neste organelo^{[18][19]}. Uma vez no *trans*-Golgi (*trans-Golgi network* -TGN), e posteriormente à triagem da carga, o transporte das proteínas (ou de lípidos) para a membrana plasmática ou outro compartimento intracelular (endossomas precoces; endossomas de reciclagem; endossomas tardios e compartimentos especializados como glândulas secretórias) é realizado através de vesículas dependentes e/ou independentes de clatrina e túbulos^{[17][18][19]}.

A via secretória inclui ainda o transporte retrógrado das proteínas ou lípidos, sendo este processo essencial para manutenção da célula, uma vez que permite o retorno de proteínas residentes para o seu compartimento de origem, permitindo a conservação da identidade dos organelos e a sua função^[18]. Este transporte pode ser realizado do sistema endolisossomal para o TGN ou do TGN para o RE: para o primeiro caso, temos o exemplo do recetor de manose-6-fosfato dos endossomas tardios Rab9 positivos para o TGN; e para o segundo caso, proteínas *misfolded* ou *chaperones* do RE, por exemplo, são entregues a este organelo através de vesículas revistas por COPI ou por extensões túbulo membranares que se estendem do Golgi ao RE^{[18][19]}.

Tal qual à via endocítica, e visto que a via secretória se encontra envolvida no transporte de proteínas e lípidos que podem servir de nutrientes, os agentes patogénicos interferem nesta via de forma a promover a sua sobrevivência. Exemplos incluem: *Brucella spp.* cujo fagossoma onde a bactéria se localiza adquire características de RE, após a exclusão dos marcadores de endossomas tardios e de lisossomas, sendo os efetores responsáveis por esta aquisição desconhecidos; *Chlamydia* (*Chlamydia trachomatis*; *Chlamydia pneumoniae*) promove a proximidade da inclusão onde se encontra ao TGN, permitindo a interceção de vesículas com esfingomielina direcionadas à superfície celular, sendo este um processo fundamental à replicação intracelular deste microrganismo^[19]; *S. typhimurium* apresenta o efector SseG, essencial à localização do vacúolo desta bactéria (SCV) nas proximidades do complexo de Golgi, embora a importância desta localização permaneça desconhecida. No entanto, estudos em células epiteliais demonstraram um efeito de inibição de *S. typhimurium* aquando da disrupção do complexo de Golgi^[19].

1.4. O citoesqueleto de actina

O citoesqueleto é uma estrutura dinâmica, constituído por uma rede de fibras presente no citoplasma das células e é responsável por três funções gerais: a mobilidade e morfologia da célula, a organização espacial do conteúdo da célula e a interação com o meio extracelular. Esta estrutura é constituída por três polímeros principais: filamentos de actina; microtúbulos; e filamentos intermediários. Neste trabalho o nosso foco vai ser o citoesqueleto de actina^[34].

A actina é uma proteína globular de 375 aminoácidos^[35] com uma massa molecular de 42 kDa que existe essencialmente em duas formas, uma forma monomérica (actina globular) e uma forma polimérica (actina filamentosa). É a interação “*head-to-tail*” de um monómero de actina (G-actina) com outros monómeros que resulta na reação de polimerização que leva à formação da actina filamentosa (F-actina)^[36]. Os filamentos de actina apresentam polaridade, distinguindo-se duas extremidades, uma extremidade “+” e uma extremidade “-”, às quais são adicionados ou removidos monómeros de actina originando um ciclo de polimerização/despolimerização^[36].

A polimerização de actina inclui três fases: nucleação, elongação e equilíbrio^[35]. A nucleação é o passo limitante da reação de polimerização, requerendo a associação de três monómeros de actina^[37], de forma a iniciar a segunda fase da reação. A fase de elongação envolve a adição de G-actina ligada a ATP nas extremidades, originando um filamento de actina, com consequente hidrólise do nucleótido a ADP. Finalmente, a fase de equilíbrio é atingida. Esta última resulta num equilíbrio entre o número de monómeros que são adicionados e dissociados das extremidades, não ocorrendo variação da massa total do filamento^[35]. Uma vez atingida a última fase, a concentração de monómeros de actina não associados denomina-se de concentração crítica. É este parâmetro que determina que a velocidade de associação de G-actina à extremidade “+” seja 5 a 10 vezes superior à da extremidade “-”, apresentando cada extremidade concentrações críticas *in vitro* de 0,1 μM e 0,8 μM , respetivamente^[35]. O facto da actina ligada a ATP se dissociar mais lentamente quando comparado com a actina ligada a ADP, contribui para esta diferença na concentração crítica das duas extremidades, resultando no processo de “*treadmilling*”, evidenciando a dinâmica associada aos filamentos de actina^[36]. Toda a dinâmica de actina é regulada por um conjunto de proteínas que ligam actina (*actin-binding proteins* - ABP), que apresentam uma diversidade de funções. Estas incluem proteínas com a aptidão de ultrapassar o passo limitante da reação de polimerização, ao estabelecer um núcleo de monómeros que servem de base à elongação (p.e. complexo Arp2/3)^[37]; proteínas como a profilina, que ao ligar-se a monómeros G-actina promove a adição destes à extremidade “+” de um filamento de actina^[35]; e proteínas como a cofilina, responsável pela exacerbação da taxa de dissociação de G-actina na extremidade “-” ao interagir com os filamentos de actina^[36].

O citoesqueleto de actina é uma estrutura altamente dinâmica envolvida em inúmeros processos essenciais da célula, incluindo no transporte vesicular, na internalização de material extracelular, na

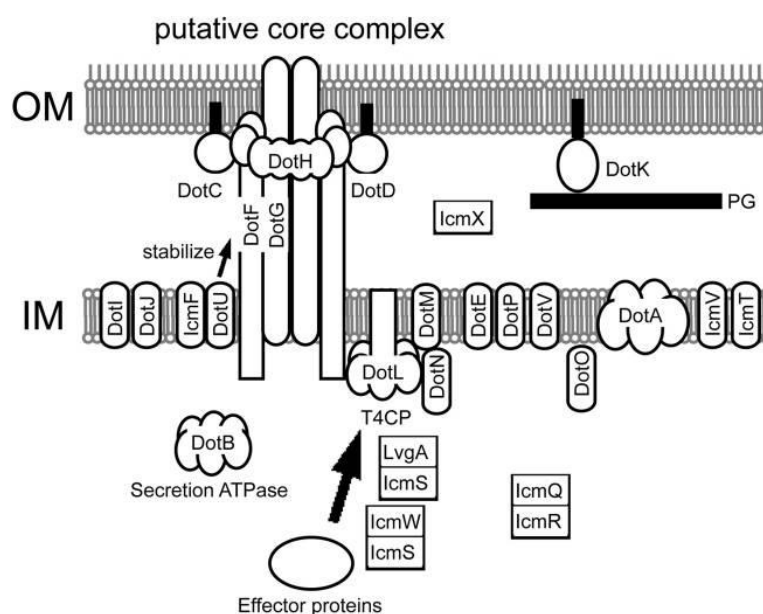
citocinese e na migração celular^{[35][36][37]}. De facto, esta estrutura é o alvo de distintas bactérias que apresentam a capacidade de modular direta ou indiretamente o citoesqueleto de actina e os seus reguladores, através de toxinas ou proteínas efetoras, influenciando os processos de internalização ou saída da bactéria da célula, de mobilização intracelular e da disseminação para um novo hospedeiro^[37]. *Clostridium botulinum*, por exemplo, recorre às toxinas C3 e C2, que através de ADP-ribosilação, afetam indireta e diretamente o citoesqueleto de actina inibindo, respetivamente, a sinalização da via de Rho e a polimerização de filamentos de actina^[38]. *Shigella* e *Salmonella spp.*, por sua vez, recorrem a proteínas efetoras que induzem a formação de “*ruffles*” membranares na superfície de células não fagocíticas e consequente internalização^[38]. Em *Shigella* foram identificados três efetores (IpaA; IpaB; IpaC) envolvidos na internalização da bactéria em células epiteliais. IpaC, nomeadamente, demonstrou a capacidade de induzir a polimerização de actina através da interação e ativação da GTPase Cdc42. No caso de *Salmonella typhimurium*, há quatro efetores (SopE, SipA, SipC e SptA) com a aptidão de induzir o rearranjo de actina: estudos definem SopE como um efector capaz de ativar as GTPases Cdc42 e Rac1 ao promover a troca GDP/GTP; SipC como um indutor de formação de feixes de actina (*bundling*); e SipA promove a despolimerização dos filamentos de actina e consequentemente contribui para a estabilização dos mesmos^[38]. Exemplos adicionais de bactérias que influenciam a estrutura de actina incluem a *Listeria* e a *Rickettsia* que através dos seus efetores induzem a formação de uma cauda de actina, através da qual disseminam para a célula hospedeira adjacente^[38]. Dentro do género *Listeria*, *Listeria monocytogenes* promove a formação desta cauda através do seu efector ActA que interage com o complexo Arp2/3, induzindo a polimerização de actina^[38].

1.5. Sistema de secreção do tipo IVB (T4SSB) e proteínas efetoras

Muitas bactérias patogénicas possuem como fatores de virulência proteínas denominadas de efetores, que são transportadas para o interior das células hospedeiras. Estes efetores são essenciais na obtenção de nutrientes e membranas para o LCV e manutenção da integridade celular, fomentando a sobrevivência e a replicação da bactéria no hospedeiro^[39], permitindo o estabelecimento de um nicho fundamental à bactéria. A secreção destes efetores para a célula hospedeira é realizada através de uma maquinaria designada de sistema de secreção, existindo diferentes tipos, nomeadamente sistema de secreção do tipo I ao tipo VI (T1SS, etc.). *L. pneumophila* não é exceção, codificando uma variedade de sistemas de secreção que contribuem para a sua virulência, destacando-se os sistemas de secreção do tipo II e do tipo IVB.

O sistema do tipo II, denominado de Lsp, é responsável pela secreção de 25 efetores, sendo o processo de secreção realizado em dois passos, que incluem o reconhecimento pelo sistema T2SS, aquando da secreção dos fatores proteicos para a região periplasmática, seguido da saída das mesmas através de um poro especializado^[8]. Subsequentemente, estes mesmo efetores aquando do escape para o citosol,

Um sistema de secreção do tipo IV (neste caso, do tipo IVB) (**Figura 1.4**), por sua vez, denominado de sistema de secreção Dot/Icm (*defective organelle trafficking/intracellular multiplication*) é fulcral à sobrevivência e replicação da bactéria no interior do hospedeiro (macrófago ou ameba)^[14]. A importância deste sistema na patogenicidade de *L. pneumophila* torna-se evidente quando da observação dos genomas de diferentes estirpes deste microrganismo. A análise de 180 estirpes de *L. pneumophila*, incluindo as estirpes Paris, Lens e Philadelphia 1, demonstraram a conservação de 25 genes, responsáveis pela codificação deste sistema, situados no mesmo cromossoma, em duas regiões genômicas conservadas^[14]. Adicionalmente, estudos de comparação de sequências e de hibridação DNA/DNA demonstraram a conservação da região genômica acima mencionada entre 17 espécies de *Legionella*. Mais, mutantes *dot/icm* demonstraram incapacidade de escapar à via endocítica, adquirindo marcadores endossomais (p.e. GTPase Rab5; v-ATPase; LAMP-1)^[14].



Este complexo proteico atravessa as membranas interna e externa da bactéria, bem como a membrana plasmática da célula eucariótica, permitindo a secreção direta das proteínas efetoras para o citoplasma da célula hospedeira. Assim, este sistema é responsável pela secreção de mais de 350 efetores de *L. pneumophila*^[8], sendo estes cruciais à reprogramação da via endocítica e consequente evasão da mesma.

No entanto, a deleção de um gene que codifica um único efetor resulta frequentemente na ausência de fenótipo, não afetando a capacidade da bactéria de formar o LCV e de se replicar dentro do mesmo. Pondera-se por isso uma redundância destas proteínas efetoras, o que sugere que existem papéis compensatórios para duas ou mais proteínas que podem apresentar uma atividade biológica semelhante ou exibir atividades diferentes que interferem na mesma via ou processos celulares^[8]. As funções desempenhadas pelos efetores são várias e diversas (**Figura 1.5**), interferindo em diferentes processos celulares, nomeadamente na modulação do tráfego vesicular, incluindo nas vias endocítica e secretória, na modulação do citoesqueleto de actina e das vias de morte de celular.

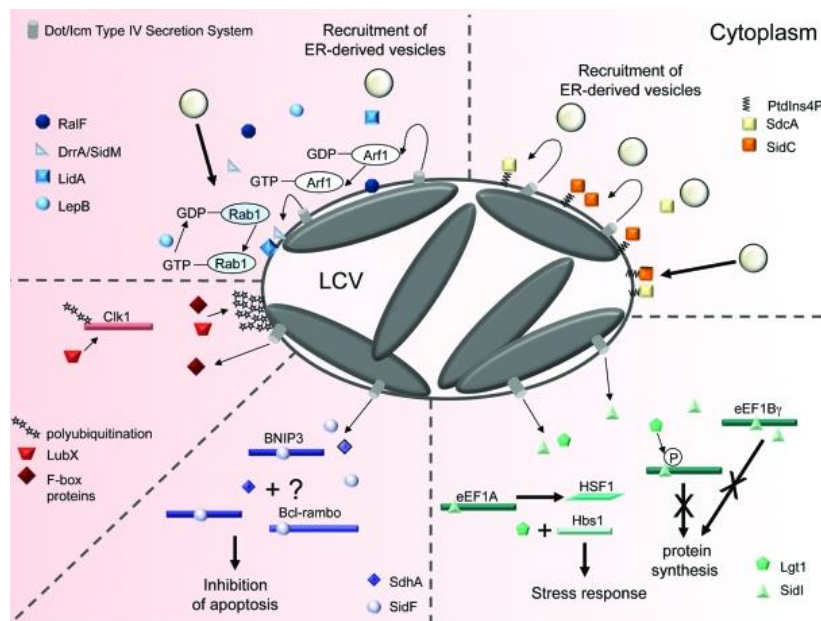


Figura 1.5 – *L. pneumophila* modula diferentes vias do hospedeiro através de vários fatores de virulência. Os efetores de *L. pneumophila* têm como alvos processos como (a partir do canto superior esquerdo, na direção dos ponteiros do relógio): o tráfego membranar, através da interação com GTPases, os fosfolipídios membranares, a síntese proteica e a maquinaria de resposta ao stress, a apoptose celular e as vias de ubiquitinação do hospedeiro. Círculos grandes correspondem a vesículas com origem no Retículo Endoplasmático. Imagem retirada de Newton H. J. *et al.*^[41].

O modo complexo e coordenado como vários efetores atuam numa determinada via é já bem conhecido, por exemplo, as proteínas efetoras RalF, SidM/DrrA, LidA e LepB, estão envolvidas no recrutamento de determinadas GTPases para o vacúolo que contém *L. pneumophila*, interferindo deste modo particularmente com a via secretória. SidM/DrrA, LidA e LepB estão envolvidas no recrutamento da GTPase Rab1, proteína fundamental à via secretória, para o LCV (**Figura 1.6**). Rab1 é uma proteína eucariótica que localiza no complexo de Golgi, contribuindo particularmente para o processo de ancoragem (*tethering*) e fusão das vesículas do RE com direção ao complexo de Golgi^[16]. Esta GTPase é recrutada para o LCV através da proteína efetora SidM, com atividade de GEF e de GDF, resultando na alteração do tráfego de vesículas RE-Golgi, agora direcionadas ao LCV. Paralelamente, a proteína

LidA promove a forma ativa de Rab1, ao impedir a ação das GAPs^[31], auxiliando SidM. LepB, por sua vez, é uma proteína GAP, sendo por isso responsável pela inativação da Rab1, contrariando a atividade de SidM^[31]. Do mesmo modo, a proteína efetora Ankx interfere com a atividade de Rab1 e consequentemente com a via secretória ao inibir o transporte de vesículas entre o RE e o complexo de Golgi, evidente pela presença de fragmentação neste último organelo^[16]. Adicionalmente, estudos demonstraram que mutantes *ankx* apresentavam uma maior co-localização com compartimentos LAMP-1 (*Lysosomal associated membrane protein 1*) positivos, sugerindo uma função no escape à fusão com endossomas tardios e lisossomas^[16]. Contrariamente, Lem3 é o efetor que garante a reversibilidade da reação a que Rab1 é sujeita por Ankx^[31]. RalF, por sua vez, é uma proteína efetora com atividade de GEF responsável pelo recrutamento e ativação de Arf1, uma GTPase envolvida no “*budding*” de vesículas e transporte retrógrado do Golgi para o RE^[16]. Este efetor tem a capacidade de autorregular a sua atividade de GEF através de um domínio no C-terminal, que se torna inacessível à Arf1^[31].

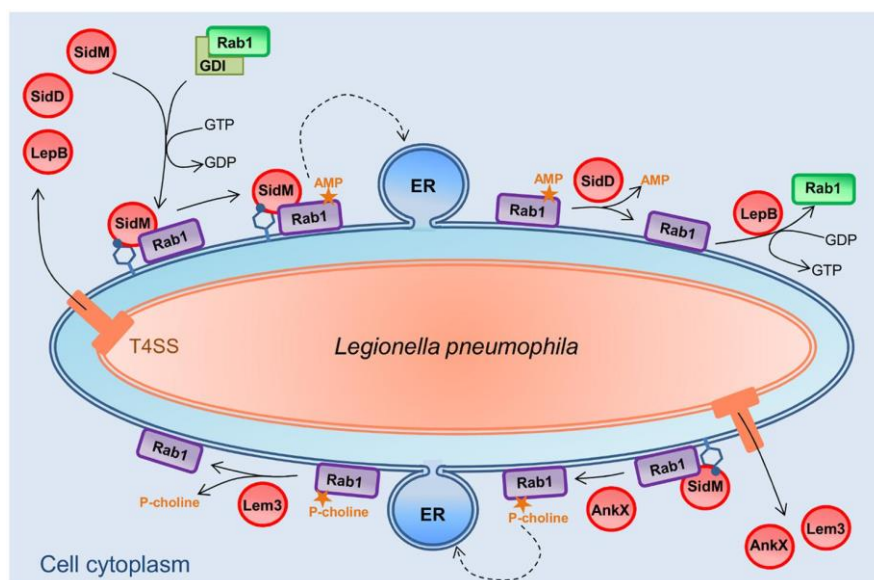


Figura 1.6 - Biogênese do LCV através de modificações pós-traducionais da GTPase Rab1 por *L. pneumophila*. O recrutamento de vesículas com origem no RE para o LCV é orquestrado através de um conjunto de efetores translocados através do sistema de secreção do tipo IVB (T4BSS). SidM é responsável pela dissociação entre Rab1 e GDI, através da sua atividade de GEF. SidM, subsequentemente, através de AMPilação, bloqueia Rab1 na forma GTP-Rab1, permitindo o recrutamento de vesículas RE para a superfície do LCV. SidD remove o grupo AMP resultante da reação de AMPilação, permitindo a atividade de GAPs como o LepB. A atividade deste último resulta na remoção de Rab1 do LCV. AnkX, por sua vez, induz uma reação de fosfocolinação, apresentando um efeito semelhante ao da reação de AMPilação. Lem3, contrariamente, é responsável pela remoção do grupo de fosfocolina de Rab1. ER, Reticulo endoplasmático; GTP, guanosina trifosfato; GDP, guanosina difosfato; GDI, inibidor de dissociação GDP. Imagem retirada de C. Michard *et al.*^[42].

Outros efetores modulam as vias de morte celular. SdhA, por exemplo, é fundamental à integridade da membrana do LCV^[31] e atua a nível das vias de sinalização pró-apoptóticas, fornecendo o tempo necessário à replicação da bactéria ao evitar a morte prematura da célula hospedeira^[16]. Adicionalmente, foram identificados os fatores de virulência Vip (VipA, VipD e VipF), através de um estudo realizado

em 2005 por Shohdy *et al.*, onde uma biblioteca de DNA genômico de *L. pneumophila* foi testada de forma a identificar genes que codificavam para proteínas capazes de inibir o tráfego vacuolar em levedura, recorrendo à proteína híbrida repórter CYP-Inv (fusão entre Inv e carboxipeptidase Y)^[43]. Estudos posteriores mostraram que VipD é uma fosfolipase^[31] que atua ao nível dos fosfolípidos, incluindo os fosfoinositóis (PIs) mono-fosforilados. Pensa-se que este efector esteja relacionado com a capacidade de escape da bactéria à via endocítica, uma vez que ao estabelecer uma ligação com Rab5, este efector catalisa a remoção de PtdIns(3)P das membranas endossomais^[8]. A remoção de PtdIns(3)P resulta, por sua vez, na perda de efetores como o EEA1, tornando a fusão do compartimento endossomal incompetente^[16]. Finalmente a proteína efetora VipA é reconhecida como um nucleador de actina, apresentando por isso a capacidade de aumentar a taxa de polimerização de actina. No entanto, o seu papel na patogenicidade de *L. pneumophila*, bem como nas vias de sinalização celular, permanece desconhecido.

1.6. Proteína efetora VipA

L. pneumophila apresenta também a capacidade de modular o citoesqueleto de actina através da proteína efetora VipA, constituída por 339 aminoácidos^[44] e com um peso molecular de 38 kDa. A realização de um ensaio de translocação com uso da proteína repórter adenilato ciclase, ativada pela calmodulina eucariótica, comprovou a translocação de VipA, através do sistema de secreção Dot/Icm do tipo IVB, para o citosol de macrófagos^[43]. Esta proteína apresenta 3 regiões principais: a região N-terminal (aminoácidos M₁ até F₁₃₃), essencial à interação com Rab5 e à capacidade de VipA interferir no transporte vacuolar em levedura; região que contém o motivo *Coiled-coil* (F₁₃₃-T₂₀₆), associada a interações proteína-proteína; e a região C-terminal (T₂₀₆-L₃₃₉), fundamental e suficiente para a interação com a actina (**Figura 1.7**). Mais, apresenta ainda 2 putativos motivos característicos de proteínas eucarióticas e bacterianas que demonstram a aptidão de modular o citoesqueleto de actina: sequência de Asparagina-Prolina-Tirosina e um motivo rico em prolinas^{[44][45]}.



Figura 1.7 – Representação da estrutura primária da proteína VipA. NH₂, extremidade N-terminal. CC, *coiled coil*. COOH, extremidade C-terminal. NPY, motivo asparagina-prolina-tirosina. Pro, sequência rica em prolinas. Imagem retirada de Bugalhão *et al.*^[44].

A interação direta desta proteína com a actina foi investigada num estudo de 2012, tendo sido determinada uma função da VipA na polimerização de actina, onde a presença deste efector induzia uma diminuição da fase *lag* do passo de nucleação e um aumento da taxa de polimerização de actina^[45]. Um aumento moderado na adição de monómeros de actina durante a elongação foi observado, embora os

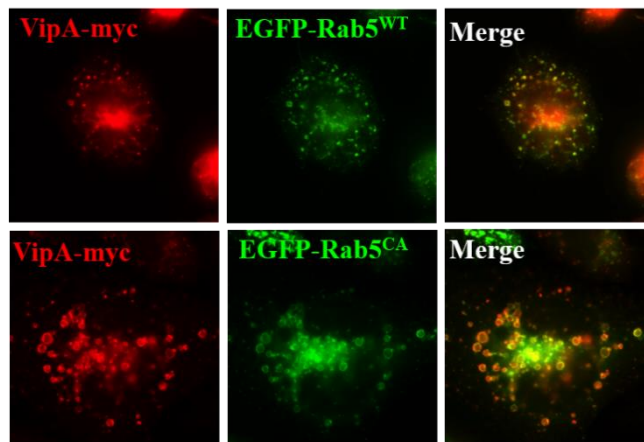
resultados desta investigação apontem para um favorecimento da nucleação^[45]. Paralelamente, foi estabelecida uma relação entre a capacidade de VipA de se associar à actina e de inibir o tráfego membranar, observado na levedura. Finalmente, a expressão ectópica da proteína VipA em levedura e em células de mamífero, bem como da proteína nativa translocada para macrófagos durante a infecção, demonstrou uma co-localização desta com os endossomas precoces e com F-actina^[44].

1.7. Interação da proteína efetora VipA com a proteína eucariótica GTPásica Rab5

A proteína GTPásica Rab5 orchestra todo o processo dinâmico ligado aos endossomas precoces, apresentando um papel fundamental na regulação da via endocítica, nomeadamente no processo de maturação dos endossomas precoces a endossomas tardios e posterior fusão com os lisossomas. Tendo em conta esta função, e sabendo que a eliminação de agentes patogénicos de células hospedeiras obedece ao processo de maturação e consequente degradação hidrolítica lisossomal, não é inaudito que esta GTPase ou os seus efetores sejam alvo das proteínas efetoras secretadas por diferentes bactérias. O efector SopB de *S. enterica*, por exemplo, é uma fosfatidilinositol fosfatase que atrasa a maturação endocítica através da remoção de PtdIns(4,5)P₂ e consequente redução da carga superficial membranar^[46], resultando na retenção de Rab5 e dos seus efetores no SCV (*Salmonella-containing vacuole*). *M. tuberculosis*, por outro lado, interfere na formação de PtdIns(3)P na membrana, afetando por isso o recrutamento de Rab5 e travando assim o processo de maturação. Do mesmo modo, a proteína efetora VipD de *L. pneumophila* ao interagir com Rab5 e Rab22 ativa a sua atividade de lipase, resultando na remoção de PtdIns(3)P das membranas e evitando assim o recrutamento de marcadores endossomais como EEA1^[46]. O efector de *L. pneumophila* VipA foi identificado como uma proteína que interferiria no tráfego membranar em levedura^[43], no entanto o mecanismo por detrás deste efeito ainda não foi descoberto.

Estudos posteriores estabeleceram uma interação entre a proteína GTPásica Rab5 e a proteína efetora de VipA (Franco *et al.*, não publicado). Ensaio de microscopia demonstraram uma co-localização entre VipA-myc e as diferentes formas de EGFP-Rab5 (EGFP-Rab5^{WT}; EGFP-Rab5^{CA}) em células de mamífero (**Figura 1.8 A**). Adicionalmente, foram realizados ensaios de co-imunoprecipitação que corroboraram os resultados constatados por microscopia. A interação entre estas duas proteínas torna-se evidente aquando da presença de banda de VipA na fração ligada dos *immunoblots*, resultante da co-imunoprecipitação das formas “selvagem” e ativa de GFP-Rab5 (GFP-Rab5^{WT}; GFP-Rab5^{CA}) com VipA^{WT}-myc (**Figura 1.8 B**). Mais, a partir deste ensaio, agora na presença do mutante cujo N-terminal foi deletado (VipA^{ΔNH₂}-myc), constata-se a ausência de banda na fração ligada, determinando assim a região N-terminal da proteína VipA como a essencial à interação com a Rab5 GTPase, uma vez que a deleção desse domínio leva à ausência da banda previamente observada aquando da precipitação na presença de VipA^{WT}-myc (**Figura 1.8 B**). Finalmente, um ensaio de duplo híbrido em bactéria foi realizado reforçando os resultados obtidos nos ensaios acima.

A



B

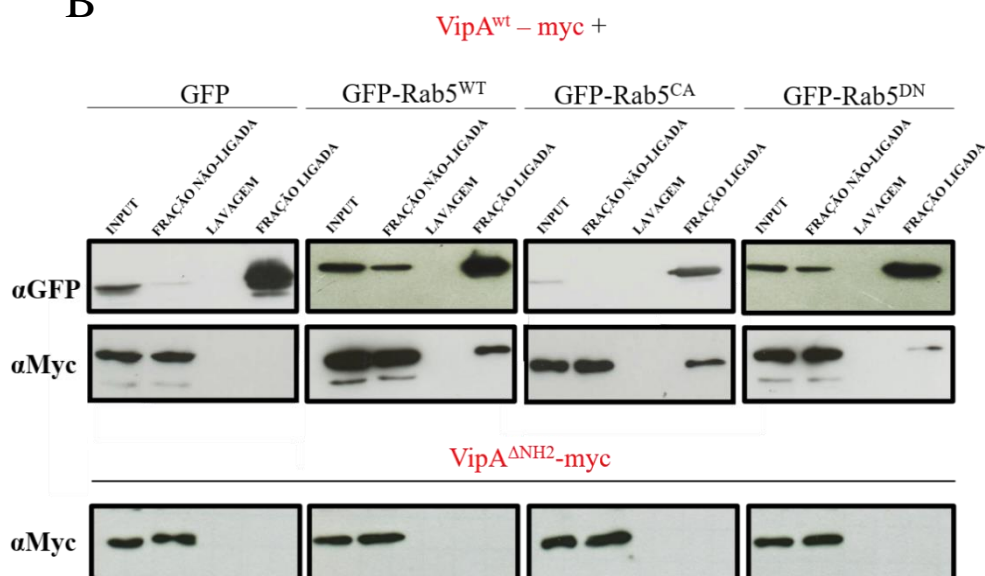


Figura 1.8 - VipA, uma proteína efetora de *Legionella pneumophila*, interage com Rab5, uma pequena proteína GTPásica eucariótica. Células de mamífero foram transfectadas com plasmídeos que codificam as proteínas VipA-myc e diferentes formas de Rab5. (A) A co-localização entre VipA-myc e as formas de EGFP-Rab5 (EGFP-Rab5^{WT} e EGFP-Rab5^{CA}) foi observada por microscopia. Após fixação, a marcação foi realizada através do uso de anticorpos contra myc. Imagens apresentadas foram recolhidas num microscópio Zeiss Axiomager D2. (B) A precipitação de GFP-Rab5 foi feita através de anticorpos contra GFP, e a interação com VipA^{WT}–myc e VipA^{ANH2}–myc foi observada através de um *immunoblot*, recorrendo aos anticorpos anti-myc e anti-GFP.

1.8. Objetivos

Tendo em conta a interação VipA-Rab5 observada em estudos precedentes, o principal objetivo desta tese de mestrado é determinar os mecanismos celulares e moleculares a partir dos quais a VipA subverte o citoesqueleto de actina e o tráfego vesicular, através da sua associação com a actina e Rab5. De forma

a completar este objetivo procurou-se: estabelecer o efeito de Rab5 na reação de polimerização de actina mediada por VipA, através de ensaios de actina-pireno *in vitro*; verificar a presença da interação VipA-Rab5 em contexto de infecção recorrendo a ensaios de co-imunoprecipitação; e observar a interação de estirpes relevantes de *Legionella pneumophila* com a via endocítica.

2. Materiais e Métodos

2.1. Crescimento bacteriano

As estirpes de *Escherichia coli* (*E. coli*) BL21 (DE3) (**Tabela 2.1**) foram inoculadas em placas de LA (*Lysogeny Broth* [LB] com 15g/L de agar) (**anexos-Tabela A1**) com 100 µg/mL de ampicilina, *overnight* (O/N) a 37 °C. Subsequentemente, 2 a 3 colónias das mesmas foram inoculadas em meio líquido LB (**anexos-Tabela A1**) com 100 µg/mL de ampicilina e o crescimento feito a 37 °C com agitação.

As estirpes de *Legionella pneumophila* (*L. pneumophila*) (**Tabela 2.1**) foram inoculadas em placas de CYE (*Charcoal-Yeast Extract Agar*) (**anexos-Tabela A1**), tendo ficado a incubar a 37 °C durante 2 a 3 dias. Posteriormente, as respetivas colónias foram inoculadas no meio líquido AYE (*ACES buffer Yeast Extract*) (**anexos-Tabela A1**) e o seu crescimento decorreu a 37 °C O/N, com agitação. Quando apropriado, foi adicionado a cada um destes meios 5 µg/mL de cloranfenicol ou 5 µg/mL de gentamicina.

2.2. Sobreexpressão e purificação por cromatografia de afinidade das proteínas His₆-VipA, GST-Rab5 e respetivas variantes

As estirpes de *E. coli* BL21 (DE3) (**Tabela 2.1**) contendo um plasmídeo que codifica para a proteína His₆-VipA^{WT} foram inoculadas em 1 L de meio LB (**anexos-Tabela A1**) e incubadas a 37 °C, com agitação (130 rpm), numa incubadora orbital (Innova® 44R), durante 16 a 18 horas, em meio de autoindução (**anexos-Tabela A1**). As células foram recolhidas por centrifugação a 5000 rpm, 20 minutos, 4°C (centrífuga SORVALL® RC-5C PLUS) e os *pellets* ressuspensos em 20 mL de tampão de lise (**anexos-Tabela A1**). As células foram então lisadas por sonicação (UP200S, Hielscher) (10 ciclos a 0,5, com pulsos de 1 minuto seguidos por 1 minuto no gelo e uma amplitude de 0,8), sendo adicionado 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) após o 1º ciclo (e de 20 em 20 minutos). Posteriormente, os lisados foram centrifugados a 10000 rpm, 2x30minutos a 4 °C (centrífuga 5804 R; Eppendorf) de forma a separar os componentes celulares não solúveis (*pellet*) da proteína de interesse (sobrenadante). A coluna de purificação foi preparada com 2 mL de resina Ni²⁺-NTA (*nickel-nitrilotriacetic acid*) (HisPurTM Ni-NTA Superflow Agarose; Thermofisher) e equilibrada com 5 mL do tampão de lise. Após a adição do sobrenadante à coluna foi recolhida a fração de *flowthrough* (FT) e subsequentemente as frações de lavagem (W1 e W2) através de 2x10 mL do tampão de lavagem (**anexos-Tabela A1**). A proteína recombinante de interesse foi posteriormente eluída através da passagem de 5 mL de tampões com diferentes concentrações de imidazole (100, 200, 300 e 500 mM) (**anexos-Tabela A1**). O processo efetuado para a obtenção da proteína His₆-VipA^{ΔNH2} foi semelhante ao realizado para His₆-VipA^{WT}, no entanto inocularam-se apenas em 100 mL de LB. Adicionalmente, a purificação de His₆-VipA^{ΔNH2} incluiu a preparação prévia da resina de Ni²⁺-NTA para posterior

incubação com o sobrenadante. A preparação desta última consistiu na centrifugação (800 g, 1 minuto) à temperatura ambiente (Heraeus Pico 17; Thermo fisher) de 2 mL de resina, descarte do sobrenadante e subsequentes lavagens com 2x1 mL de dH₂O e com 2x1 mL do tampão de lise, sendo por fim ressuspensa em 1 mL deste último tampão. A resina foi então incubada durante 1 hora com o sobrenadante, a 4°C, numa placa de agitação. A recolha das diferentes frações foi realizada como descrito anteriormente.

Tabela 2.1 – Estirpes de *E. coli* e *L. pneumophila* utilizadas neste trabalho.

Estirpe		Genótipo Relevante/ Plasmídeo	Proteína Expressa	Referência
<i>E. coli</i>	BL21 (DE3)	F(-) <i>ompT gal dcm Ion</i> <i>hsdSB(rB-mB-) λ(DE3[lacI</i> <i>lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7</i> <i>nin5])</i>	-	Studier e Moffatt, 1986
	BL21 (DE3)	pET15b-vipA	His ₆ -VipA ^{WT}	Franco <i>et al.</i> , 2012
		pIF358	His ₆ -VipA ^{ΔNH2}	Bugalhão <i>et al.</i> , 2016
		pIF415	GST-Rab5 ^{WT}	Franco <i>et al.</i> , não publicado
		pIF416	GST-Rab5 ^{CA}	Franco <i>et al.</i> , não publicado
		pIF417	GST-Rab5 ^{DN}	Franco <i>et al.</i> , não publicado
<i>L. pneumophila</i>	JR32	<i>Wild type</i>	-	Sadosky <i>et al.</i> , 1993
	3118	<i>ΔdotA</i>	-	Sadosky <i>et al.</i> , 1997
	LPIF03	<i>ΔvipA::Kan^R</i>	-	Franco <i>et al.</i> , 2012
	LPIF159	<i>ΔvipA::Kan^R</i> pMMB207c::p _{TAC} -3xFLAG- VipA	3xFLAG-VipA	Franco <i>et al.</i> , não publicado
	LPIF160	<i>ΔdotA</i> pMMB207c::p _{TAC} - 3xFLAG-VipA	3xFLAG-VipA	Franco <i>et al.</i> , não publicado
	LPJS1	<i>ΔvipA::Kan^R</i> pMMB207c::p _{VipA} -4xHA- VipA	4xHA-VipA	Franco <i>et al.</i> , não publicado
	LPIF145	<i>ΔvipA::Kan^R</i> pMMB207c::p _{TAC} 4xHA-VipA pGAH123::p _{TAC} -GFP	4xHA-VipA GFP	Franco <i>et al.</i> , não publicado
	LPIF146	<i>ΔvipA::Kan^R</i> pGAH123::p _{TAC} -GFP	GFP	Franco <i>et al.</i> , não publicado

As estirpes de *E. coli* BL21 (DE3) (**Tabela 2.1**) contendo plasmídeos que codificam para as proteínas GST-Rab5^{WT}, GST-Rab5^{CA} ou GST-Rab5^{DN} foram inicialmente inoculadas em 5 mL de LB com 100 µg/mL de ampicilina e incubadas com agitação (130 rpm) a 37 °C O/N (OLS200 Grant). Posteriormente, 4 mL deste pré-inóculo foi adicionado a 200 mL do mesmo meio (diluição de 1:50) e o crescimento prosseguiu nas mesmas condições. A densidade ótica (OD₆₀₀) da cultura foi medida a intervalos de 30 minutos até se obter uma OD₆₀₀ de 0,5, altura em que foi adicionado 1 mM de isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) de forma a induzir a expressão das proteínas de interesse. Após 4 horas adicionais de crescimento, as células foram recolhidas através de uma centrifugação a 5000 rpm, 10 minutos, 4 °C (centrífuga 5804 R; Eppendorf) e os *pellets* guardados a -20 °C, sendo ressuspensos no dia seguinte em 15 mL de tampão fosfato de sódio (PBS) a 4 °C. As células foram lisadas e as proteínas de interesse recolhidas no sobrenadante como descrito anteriormente no caso da His₆-VipA. Para a purificação das proteínas GST-Rab5^{WT} e GST-Rab5^{CA} recorreu-se a colunas previamente preparadas contendo 1 mL de resina de glutationa sefarose e equilibradas com 10 mL de PBS. Após a adição do sobrenadante à coluna cromatográfica foi recolhida a fração do *flowthrough* (FT), tendo sido efetuadas 3x10 mL de lavagens com PBS (frações W1, W2 e W3). A eluição das proteínas, por sua vez, foi feita através da passagem de 10 mL do tampão de eluição (10 mM de glutationa; **anexos-Tabela A1**). No caso da purificação de GST-Rab5^{DN}, foi necessário proceder à preparação da coluna de cromatografia obedecendo a um processo semelhante ao usado na preparação da resina no caso de His₆-VipA^{ΔNH₂}, pelo que o sobrenadante do lisado contendo a proteína foi incubado com 1 mL de resina de glutationa sefarose, previamente equilibrada em PBS, antes de se proceder à purificação descrita acima para GST-Rab5^{WT} e GST-Rab5^{CA}.

2.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

A partir das frações obtidas no processo de purificação das proteínas recombinantes His₆-VipA, GST-Rab5 e respetivas variantes foram preparadas amostras com um volume de 20 µL (16 µL de cada fração com adição de 4 µL de 5x SDS *loading buffer* [LB]), sendo estas posteriormente incubadas num banho seco a 100°C durante 5 minutos. Subsequentemente, 15 µL de cada amostra preparada foram corridos em SDS-PAGE (gel de concentração 5%; gel de resolução 12%). A eletroforese foi realizada à voltagem constante de 150 V, na presença do tampão de corrida Tris-Glicina, e os géis obtidos após a corrida foram corados com a solução de Coomassie durante 30 minutos e posteriormente incubados durante 2 horas com a solução de *destaining* (todas as soluções descritas em **anexos-Tabela A1**).

As proteínas, antes de quantificadas, foram dialisadas a 4 °C O/N em 2 L de tampão G-Mg (**anexos-Tabela A1**), com agitação, através de uma membrana de celulose (SnakeSkin[™] Dialysis Tubing; Thermo Scientific) cujo *cut-off* é de 7 kDa.

2.4. Immunoblotting

Todas as amostras para análise por “immunoblotting” foram separadas num SDS-PAGE, à voltagem constante de 150 V. Posteriormente, foi realizada a transferência para a membrana de nitrocelulose, através do sistema de transferência “Trans-Blot Turbo Transfer System” (Bio-Rad). Deste modo, o gel e a membrana, bem como 6 papéis filtro para “immunoblotting” foram incubados com o tampão de transferência (**anexos-Tabela A1**), após a qual foi realizada a seguinte montagem: 3 papéis -> membrana -> gel -> 3 papéis (colocação da montagem na base com o ânodo (+); fechar cassete com a tampa com o cátodo (-)). Após a transferência, efetuada recorrendo ao programa padrão (25 V, 1.0 A, 30 minutos) do sistema usado, a membrana é imediatamente bloqueada, durante 1h, com uma solução de leite em pó (**anexos-Tabela A1**) e posteriormente incubada durante 1h com o anticorpo primário. Ao fim desse período, a membrana foi lavada 3x5 minutos com PBS contendo 0,2% (v/v) de Tween (**anexos-Tabela A1**), e subsequentemente incubada, durante 1h, com o anticorpo secundário associado à HRP (*Horseradish peroxidase*). Finalmente, a membrana foi lavada 3x5 minutos com PBS contendo 0,2% (v/v) de Tween sendo transferida para uma cassete. Na câmara escura, é adicionada à membrana 1 mL da solução de deteção do kit SuperSignal West Pico PLUS (Thermo Fisher Scientific). Subsequentemente, para deteção do sinal, são usadas chapas que são incubadas junto da membrana, durante diferentes tempos, e expostas sequencialmente à solução de revelação e fixação (com lavagem em água a seguir a cada uma).

Nos ensaios de *immunoblotting* foram usados os anticorpos primários, anti-HA (1:1000; Roche Applied Science; ratazana) e anti-GFP (1:1000; Sicgen antibodies; cabra), e os anticorpos secundários associados a HRP, anti-ratazana (1:10000; Sigma Aldrich; cabra) e anti-cabra (1:10000; Jackson ImmunoResearch; burro), ambos diluídos em solução com leite em pó.

2.5. Quantificação de proteínas pelo Método de Bradford

A concentração das proteínas purificadas foi determinada através do método de Bradford. Para tal procedeu-se inicialmente à determinação de uma equação de reta, adicionando a 1 mL do reagente (NZYBradford, NZYtech) diferentes concentrações de BSA (*Bovine Serum Albumin*), e registando os valores das OD₅₉₅. Para quantificação das proteínas foram preparadas amostras com diferentes volumes de proteína (5, 10, 20 e 50 µL) e com o volume necessário do reagente de Bradford de modo a obter um volume final de 1 mL. O cálculo das concentrações foi feito através da equação:

$$[Proteína] = \frac{OD_{595} + ordenada\ da\ origem}{declive\ da\ reta}$$

Os valores da ordenada da origem e do declive da reta foram obtidos através da curva de calibração determinada (**anexos-Figura A1**).

A concentração da actina e da pireno-actina foram calculadas recorrendo ao método referido acima e seguindo um procedimento semelhante, construindo-se uma nova curva de calibração (**anexos-Figura A2**) e sendo a leitura das OD₅₉₅ realizada através do Nanodrop. De forma a quantificar as proteínas foram preparadas amostras com diferentes concentrações de proteína (2, 5 e 10 µL), perfazendo o volume de 20 µL com o reagente de Bradford. As concentrações foram calculadas recorrendo à equação acima e aos valores da ordenada da origem e declive de reta obtidos na curva de calibração.

2.6. Ensaio de actina-pireno *in vitro*

Este ensaio foi executado de forma a determinar o efeito das diferentes formas de GST-Rab5 (GST-Rab5^{WT}; GST-Rab5^{CA}; GST-Rab^{DN}) na polimerização de actina mediada por His₆-VipA. A actina e pireno-actina (*rabbit muscle actin* 99%; Cytoskeleton) usadas em cada ensaio foram preparadas no dia anterior e mantidas no tampão G-actina (**anexos-Tabela A1**). A sua concentração foi determinada pelo método de Bradford, no Nanodrop. A preparação das amostras de actina marcada (pireno-actina) e não marcada (G-actina) consistiu na ressuspensão de 20 µL (2x10 µL) de actina e 5 µL de pireno-actina em 250 µL do tampão de G-actina (com adição de 2 mM de adenosina trifosfato (ATP) e adicionalmente, no caso da actina, 0,5 mM de ditioneitol [DTT]), seguido de uma incubação de 60 minutos no gelo e finalmente uma centrifugação de 14000 rpm (MIKRO 200R) durante 60 minutos a 4 °C, após a qual foi recolhido 80% da parte superior do sobrenadante. As concentrações de actina e pireno-actina apresentavam valores de ~0,2-0,4 mg/mL e ~0,3 mg/mL, respetivamente.

A mistura de actina (“*Actin mix*”) (20 µL/amostra) foi preparada de modo a obtermos uma concentração de 2,4 µM de actina e 0,6 µM de pireno-actina (ou seja, 80% de actina não marcada e 20% de pireno-actina), em cada reação de polimerização de actina. Deste modo, a *Actin mix* é constituída por uma mistura de G-actina e pireno-actina, perfazendo-se o volume com o tampão de G-actina. Em cada ensaio, foi preparado em simultâneo um conjunto de 4 amostras, cada uma com um volume total de 70 µL, contendo: 20 µL da *Actin mix*; 500 nM de cada proteína usada nessa amostra (e.g. His₆-VipA, GST-Rab5); e tampão G-Mg de modo a perfazer 70 µL.

Antes de iniciar a polimerização, as amostras foram incubadas durante 2 minutos no tampão 10E/1M (**anexos-Tabela A1**) de modo a realizar a permuta dos iões de Ca²⁺ por Mg²⁺. Para iniciar a polimerização, foi adicionado o tampão de polimerização (KMEI) (**anexos-Tabela A1**). Os ensaios de polimerização de actina foram efetuados em cuvetes de quartzo (3 mm de comprimento da trajetória ótica) e as fluorescências foram medidas em intervalos de 1 minuto num espectrofotómetro de fluorescência Cary Eclipse, sendo que cada ensaio teve uma duração de ~60 minutos. Os comprimentos de onda de excitação e emissão foram 365 nm e 407 nm, respetivamente.

2.7. Cultura de tecidos e infecção com *L. pneumophila*

A cultura de células THP-1 (ATCC® TIB-202) foi realizada em meio líquido RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute Medium*) (**anexos–Tabela A1**) em frascos com uma área de superfície de 25 cm² (T-25) e incubadas a 37 °C em 5% (v/v) de CO₂ (incubadora ESCO). O meio foi mudado a cada 2/3 dias (de modo a manter a densidade celular inferior a 1×10⁶ células/mL) e a contagem das células foi realizada através de um hemocitômetro. Para as experiências de infecção e subsequentes ensaios de imunofluorescência, a suspensão celular foi diluída de modo a ser obtida uma concentração de 3×10⁵ células/mL. Numa placa de 24 poços, contendo lamelas, distribuiu-se 1 mL por cada poço usado e, de modo a induzir a diferenciação das células em macrófagos, foi adicionado 0,125 µg/mL de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA). Após 24 horas, o meio foi substituído por RPMI-1640 sem PMA (ficando a repousar durante mais 24 horas).

Nas experiências de infecção, e de modo a determinar os volumes de culturas de *L. pneumophila* necessários para se obter determinadas multiplicidades de infecção (MOIs), foi seguido o seguinte procedimento. As OD₆₀₀ das culturas de *L. pneumophila* foram medidas, preparando-se uma diluição de 1:10 em 4% de formaldeído (PFA). Sabendo que em *L. pneumophila* uma OD₆₀₀ = 1 corresponde a uma concentração de bactérias de 1,4×10⁹ bactérias/mL, foram efetuados os cálculos de forma a determinar os volumes a adicionar para obter uma MOI de 250 ou 500, usando a seguinte fórmula:

$$v = \frac{n \text{ (número de bactérias para dada MOI)}}{c \text{ (concentração de bactérias na cultura das estirpes)}}$$

Após adição das bactérias, a sincronização da infecção foi feita por centrifugação a 2000 rpm, 10 minutos, à temperatura ambiente (centrífuga 5804 R), após a qual se procedeu à incubação a 37°C com 5% (v/v) de CO₂. A diferentes tempos após-infecção (TPIs) (2, 5 e 8 h), a fixação das células foi efetuada com 500 µL de 4% PFA durante 20 min, sendo as células posteriormente lavadas com 2x1mL de PBS e conservadas em PBS a 4 °C.

Para ensaios de co-localização de *L. pneumophila* com endossomas precoces e lisossomas, o procedimento seguido foi o descrito acima. No entanto, o *seeding* foi realizado com uma concentração de 2,5×10⁵ de células/poços. Adicionalmente, a sincronização da infecção foi realizada por centrifugação a 2000 rpm, 5 minutos, à temperatura ambiente e as fixações foram efetuadas a tempos distintos após-infecção, nomeadamente 5, 15, 30 e 45 minutos no caso dos endossomas e 30 min, 90 min e 4 horas, para os lisossomas.

Nos ensaios de infecção para observação da localização de VipA, recorreu-se a *seedings* de 2,5×10⁵ células/poços e a uma infecção com MOI de 500, e consequente fixação a TPIs de 2, 4, 6 e 8 horas.

2.8. Imunofluorescência e Microscopia de Fluorescência

A marcação das células infectadas (fixas em lamelas) iniciou-se com a permeabilização das mesmas através de uma incubação de 20 minutos em 500 µL de PBSS (PBS com 0,1% de saponina) (**anexos-Tabela A1**), seguido de uma segunda incubação de 1 hora com 20 µL/lamela da solução com os anticorpos primários (PBSS; 10% (v/v) de soro de cavalo; anticorpos primários). Posteriormente, e após a lavagem com PBSS, as células foram novamente incubadas durante 1 hora, desta vez, com 20 µL/lamela da solução com os anticorpos secundários (PBSS; 10% (v/v) de soro de cavalo; anticorpos secundários). Por último, as lâminas foram preparadas para análise microscópica.

Para a observação da localização das proteínas VipA e Rab5 foram usados os seguintes anticorpos: primários, anti-FLAG (1:200; Sigma-Aldrich; ratinho), anti-Rab5 (1:200; SICGEN; cabra) e DAPI (1:30000; Thermofisher Scientific); e secundários, Alexa Fluor 594 anti-ratinho (1:200; Jackson ImmunoResearch; burro) e Alexa Fluor 488 anti-cabra (1:200; Jackson ImmunoResearch, bovino).

Para marcação das bactérias de *L. pneumophila* e dos endossomas precoces foram usados os anticorpos: primários, anti-*Legionella pneumophila* (Lp) ligada a rodamina (1:200; Thermofisher; coelho) e anti-EEA1 (1:200; BD Biosciences; ratinho); e secundários Alexa Fluor 488 anti-ratinho (1:200; Jackson ImmunoResearch; burro). A marcação dos lisossomas efetuou-se com os mesmos anticorpos, substituindo o anticorpo anti-EEA1 por anti-LAMP-1 (1:200; DSHB; ratinho).

Finalmente, para marcação das 3xFLAG-VipA, 4xHA-VipA e citoesqueleto de actina foram utilizados os anticorpos: primários, anti-FLAG (1:200; Sigma-Aldrich; ratinho) e Alexa Fluor 594 ligado a faloidina (1:200; Thermofisher Scientific), para as estirpes LPIF03 e LPIF159; e anti-HA (1:200; Roche Applied Science; ratazana) e Alexa Fluor 594 ligado a faloidina (1:200; Thermofisher Scientific), para a estirpe LPJS1. Na solução de anticorpos secundários foi usado o anticorpo Alexa Fluor 488 anti-ratinho (1:200; Jackson ImmunoResearch; burro). Adicionalmente as bactérias e núcleos foram marcados com DAPI (1:30000; Thermofisher Scientific).

2.9. Construção do plasmídeo pJS1

Os oligonucleótidos usados na amplificação do promotor natural da bactéria que controla a expressão da proteína VipA (através do DNA cromossômico da estirpe JR32), foram o *forward* 2674 (5'- GAT CAC GCG TCG ACA ATA AAC TGA CCA AAA TAA C – 3') e *reverse* 2675 (5'- GAT CGA ATT CTA ACT CCT GAT CCA TGG AAT C – 3'). Adicionalmente, o *primer* 2674 e o *primer reverse* do plasmídeo, 1103 (5' – GGG GAA GCT TGA GAT TTT TTT TTT CG – 3') foram usados para seleção de clones positivos. O plasmídeo utilizado na clonagem foi o pIF377, e para procedimentos gerais de clonagem, as enzimas de restrição (EcoRI e MluI; Fermentas Life Science), T4 DNA ligase (Thermofisher Scientific), e a polimerase Phusion (Thermofisher Scientific) foram usadas de acordo com as instruções dos fabricantes. Para a extração de DNA cromossômico, purificação de produtos de

PCR e de digestão, e extração de plasmídeo de uma estirpe de *E. coli*, foram usados os kits GeneElute Bacterial Genomic DNA (Sigma-Aldrich), Cleaner and Concentrator (Zymo Research), de miniprep da NZYtech, respetivamente, e seguidas as instruções dos fabricantes.

2.10. Preparação de células competentes de *E. coli* (NEB 10-β)

As células de *E. coli* (NEB 10-β) foram inoculadas em placas de LA com 100 µg/mL de estreptomicina, ficando a crescer a 37 °C O/N. Posteriormente foi preparado o pré-inóculo, onde 1 colónia da placa anterior foi inoculada em 5 mL de LB com 100 µg/mL de estreptomicina, ficando a crescer a 37 °C O/N, com agitação (150 rpm). De seguida, 3 mL do pré-inóculo foram inoculados em 300 mL de LB (diluição de 1:100) com 100 µg/mL de estreptomicina e colocado a crescer nas mesmas condições acima referidas, sendo a OD₆₀₀ medida até um valor de 0,5 ser atingido. Uma vez obtido este valor, o volume total de inóculo foi dividido por 6 tubos que foram centrifugados a 5000 rpm, 10 minutos, 4°C. O sobrenadante de cada tubo foi descartado e o *pellet* ressuscitado em 50 mL de dH₂O. Duas lavagens adicionais foram realizadas através de centrifugações (5000 rpm, 10 minutos, 4°C), sendo o *pellet* obtido, após cada centrifugação, ressuscitado sequencialmente em 25 mL e 8 mL de dH₂O. Após as lavagens, o *pellet* foi ressuscitado em 150 µL de 10% (v/v) de glicerol, arrefecido previamente a 4 °C, e alíquotas de células foram preparadas e congeladas a -80 °C. A competência das células foi testada através da transformação destas com 7 ng da diluição de 1:10 do plasmídeo pLJM3 (com resistência à canamicina), seguindo o procedimento descrito no ponto 2.11. No entanto, apenas 10 ou 100 µL das células transformadas e do controlo (só células) foram inoculadas em placas de LA com 50 µg/mL de canamicina, sendo colocadas a crescer a 37 °C O/N. A competência (UFC/µg) foi calculada tendo em conta as colónias formadas, obtendo-se assim um valor de 1,83×10⁶ UFC/µg.

2.11. Transformação de células competentes de *E. coli* (NEB 10-β)

Após uma incubação de 5 minutos no gelo das células com o produto de ligação (pJS1), a transformação foi realizada por eletroporação recorrendo a uma voltagem de 2,5 kV (MicroPulser; Bio-Rad). Subsequentemente ao pulso elétrico, as células são ressuscitadas em 1 mL de meio SOC (*Super Optimal broth with Catabolite repression*), de forma a maximizar o processo de transformação, sendo posteriormente incubadas a 37 °C, durante 1h. Ao fim desse período, as células transformadas foram centrifugadas a 4000 rpm, durante 4 minutos à temperatura ambiente e foi retirado o sobrenadante, de forma a que o volume final fosse de 150 µL. Deste modo, 150 µL das células transformadas foram plaqueadas em placas de LA com 20 µg/mL de cloranfenicol. As placas foram colocadas O/N a 37 °C.

2.12. Colony PCR

Primeiramente, foram selecionadas, ao acaso, 24 colónias de *E. coli* transformadas com o plasmídeo pJS1 e adicionadas a 30 µL dH₂O. Paralelamente foi preparada uma *mix* de PCR contendo *primer forward* 2674 do promotor, *primer reverse* 1103 do plasmídeo, e NZYTaq II polimerase, contendo cada reação um volume final de 15 µL. A presença do plasmídeo contendo o *insert* foi confirmada correndo a totalidade do produto de PCR correspondente a cada colónia num gel de agarose 1%. O plasmídeo do clone 3 foi amplificado e extraído da estirpe de *E. coli* de acordo com as instruções do kit de Miniprep da NZYtech. Foi posteriormente sequenciado (STABVIDA) recorrendo aos *primers forward* 2674 e *reverse* 2675 (previamente usados), tendo sido confirmada a integridade da região clonada.

2.13. Transformação em *L. pneumophila*

A estirpe de *L. pneumophila* cujo gene *vipA* se encontra deletado (LPIF03) foi então transformada com o plasmídeo pJS1. Para tal, foram ressuspensas 2-3 colónias da estirpe LPIF03, de uma placa com 3-5 dias, em 1 mL de 10% (v/v) de glicerol. Posteriormente, foram efetuadas 2 lavagens com 1 mL de 10% glicerol através de duas centrifugações de 5000g, 5 minutos a 4 °C. Após a segunda lavagem, as células foram ressuspensas em 200 µL de 10% glicerol. Subsequentemente, foram adicionados 500 ng do plasmídeo pJS1 às células de LPIF03 em glicerol, seguido de uma incubação de 5 minutos em gelo. A transformação ocorreu através de eletroporação a 2,5 kV e as células transformadas foram imediatamente ressuspensas em 1 mL de meio AYE, sendo transferidas para um tubo de plástico de 15 mL, onde se acrescentou 1 mL adicional de AYE. A cultura foi deixada a crescer a 37 °C, com agitação durante 6 horas. Depois desse período, as células foram recolhidas por centrifugação a 4000 rpm, 4 minutos, e ressuspensas em 100 µL do mesmo meio. Esse volume foi posteriormente plaqueado em placas de CYE com 5 µg/mL de cloranfenicol e incubadas na estufa a 37 °C, durante 3-4 dias.

2.14. Preparação de *stock* de LPJS1

Um conjunto de colónias da placa inoculada com a estirpe LPJS1 foram inoculadas em 2 mL de AYE com 5 µg/mL de cloranfenicol e deixadas a crescer a 37 °C, com agitação, O/N. No dia seguinte, foram adicionados 300 µL de 50% de glicerol a 700 µL dessa cultura, obtendo-se assim o *stock* da estirpe LPJS1 (LPIF03 x pJS1), posteriormente congelado a -80 °C.

2.15. Preparação de extrato celular de LPJS1 para *immunoblotting*

A estirpe LPJS1 foi inoculada em 2 mL de AYE com 5 µg/mL de cloranfenicol e incubada a 37 °C O/N, com agitação. Desta cultura, 750 µL foram centrifugados a 13300 rpm durante 1 minuto, à temperatura ambiente, obtendo-se o *pellet* de células. O sobrenadante foi retirado e as células ressuspensas em 100

μL de SDS LB. A amostra foi subsequentemente fervida a 100 °C, durante 5 minutos, e congelada a -20 °C.

2.16. Ensaios de translocação para o citosol de macrófagos

Em placas de 6 poços um *seeding* de 4 poços/placa com $1,5 \times 10^6$ células/poço foi efetuado, sendo estas células posteriormente infetadas com *L. pneumophila* (MOI de 100), e a sincronização de infeção efetuada por centrifugação (2000 rpm, 10 minutos, RT). As placas foram subsequentemente incubadas a 37 °C e 5% (v/v) de CO₂ durante 2 horas. Ao fim desse período, o meio foi removido e as células lavadas com 2x1 mL de PBS (previamente colocado a 4°C). Ulteriormente, a lise das células foi efetuada pela adição de 250 μL do tampão de lise (tampão Co-IP [50 mM de Tris; 500 mM de NaCl; 2 mM de EDTA] com a adição do detergente (0,1% ou 0,05 % de NP-40; 0,1% ou 0,05% de Triton-X), 1 mM de PMSF e 1x de inibidor de proteases (PI), e as placas incubadas no gelo durante 10 minutos. Uma vez terminada a incubação, as células são ressuspensas no tampão de lise e transferidas para tubos de microcentrífuga. De forma a separar a proteína de interesse de restos celulares não solúveis, foram realizadas um conjunto de centrifugações sequenciais a 14000 rpm, 4 °C, 10 minutos. Após a primeira centrifugação foi recolhido um volume de 200 μL do sobrenadante para um novo tubo, que foi novamente centrifugado, sendo recolhidos 100 μL do sobrenadante obtido. Ao tubo de microcentrífuga com os 200 e 100 μL foram adicionados, respetivamente, 200 μL de SDS LB 1x e 25 μL de SDS LB 5x. As amostras ressuspensas no SDS LB correspondente foram fervidas a 100 °C durante 10 minutos e congeladas a -20 °C. A análise por *blot* seguiu o procedimento descrito no ponto de *Immunoblotting*.

Para descartar uma possível lise bacteriana, que resultaria na libertação indesejada de proteínas bacterianas para o sobrenadante no procedimento anterior, as várias estirpes de *L. pneumophila* usadas, foram sujeitas ao procedimento anterior, mas na ausência de macrófagos. Para tal, $1,5 \times 10^8$ bactérias foram incubadas no gelo durante 10 minutos, em diferentes tampões de lise (com 0,05% Triton-X; com 10% (v/v) de glicerol e 0,05 % de NP-40; ou com 10% (v/v) de glicerol e 0,05 % de saponina). Como controlo para ausência de lise, as bactérias foram também incubadas em dH₂O à temperatura ambiente. Após 10 minutos, foram realizadas diluições seriadas. Este processo passou pela transferência de 100 μL do tubo de microcentrífuga original onde as bactérias foram inicialmente incubadas com o tampão de lise (10^0), para um primeiro tubo de microcentrífuga com 900 μL de dH₂O estéril (10^{-1}), tendo este procedimento sido repetido até à diluição 10^{-6} . Das duas diluições maiores, 100 μL foram plaqueados em placas de CYE com 5 μg/mL de cloranfenicol, sendo colocadas a crescer a 37 °C, durante 3 a 4 dias. Ao fim desse período, o número de colónias é contado.

2.17. Ensaios de unidades formadoras de colónias (UFCs)

O procedimento para o *seeding* das células THP-1 (5×10^5 células/poço) foi o descrito anteriormente, sendo as células, no entanto, incubadas durante 48 horas. Após esse período o meio é substituído por RPMI-1640 novo, e as células incubadas mais 2 horas a 37 °C com 5% (v/v) de CO₂. Paralelamente, as estirpes de *L. pneumophila* foram inoculadas em 3 mL de AYE com respetivo antibiótico e deixadas a crescer a 37 °C, com agitação.

As estirpes usadas na infeção foram crescidas como descrito anteriormente, e o *stock* de cada estirpe foi preparado. Para isto, as OD₆₀₀ foram medidas e 1 mL de *stocks* das estirpes de *L. pneumophila* foram preparados, de modo a que 100 µL contivesse uma MOI de 50 (ou seja, $2,5 \times 10^8$ bactérias/mL em RPMI).

As células foram infetadas após a adição de 100 µL de bactérias a cada poço e a sincronização de infeção foi efetuada por centrifugação (800 g, 10 minutos, temperatura ambiente). As placas foram subsequentemente incubadas a 37 °C 5% (v/v) de CO₂, durante uma hora e meia. Após este período, o meio foi removido e os poços lavados com 2x1 mL de PBS, sendo adicionado posteriormente 1 mL de RPMI com 50 µg/mL de gentamicina, sendo as placas incubadas nas condições referidas acima, durante 1h. Posteriormente, o meio foi aspirado e os poços lavados com 2x1 mL de PBS e novo meio de RPMI adicionado. As placas foram colocadas novamente a incubar nas mesmas condições, durante 0, 24 e 48 horas, sendo que a cada TPI o meio foi aspirado, os poços lavados com PBS, e as células lisadas. A lise teve início com a adição de 1 mL de dH₂O estéril, incubação durante 15 minutos, seguido de uma pipetagem (*up* e *down*) vigorosa do volume no poço. Após a lise, 100 µL foram retirados de cada poço e transferidos para o tubo de microcentrifuga com 900 µL de dH₂O, denominado 10⁻¹, a partir do qual se iniciou uma série de diluições seriadas até 10⁻³. Das duas últimas diluições maiores, 100 µL foram plaqueados em placas de CYE, sendo estas últimas deixadas a crescer a 37 °C, durante 3 a 4 dias e o número de colónias determinado. Adicionalmente, foram também plaqueados 100 µL das diluições 10⁻⁴ e 10⁻⁵ correspondentes aos *stocks* das estirpes usadas, de modo a verificar o número de bactérias usadas aquando da infeção.

3. Resultados

Estudos precedentes demonstraram através de ensaios de co-imunoprecipitação, de co-localização e de ensaios de duplo-híbrido em bactéria, a existência de uma interação entre VipA, proteína efetora de *L. pneumophila*, e Rab5, proteína eucariótica GTPásica (Franco *et al.*, não publicado). Este trabalho teve como objetivos determinar a influência de Rab5 na polimerização de actina mediada por VipA, averiguar a interação de VipA-Rab5 em contexto de infecção e estudar a interação de estirpes relevantes de *L. pneumophila* com a via endocítica.

3.1. Efeito da Rab5 na polimerização de actina mediada por VipA

Ensaio *in vitro* de actina-pireno foram efetuados de modo a determinar se GST-Rab5 e respectivas variantes interferem na polimerização de actina mediada por His₆-VipA. Para tal, foi necessário primeiramente proceder à purificação destas proteínas, utilizando estirpes de *E. coli* que permitem a sobreexpressão e subsequente purificação das mesmas através de epítomos.

3.1.1. Purificação das proteínas His₆-VipA, GST-Rab5 e respectivas variantes

As proteínas His₆-VipA, GST-Rab5 e respectivas variantes representadas na **figura 3.1** foram purificadas através de um processo cromatográfico.

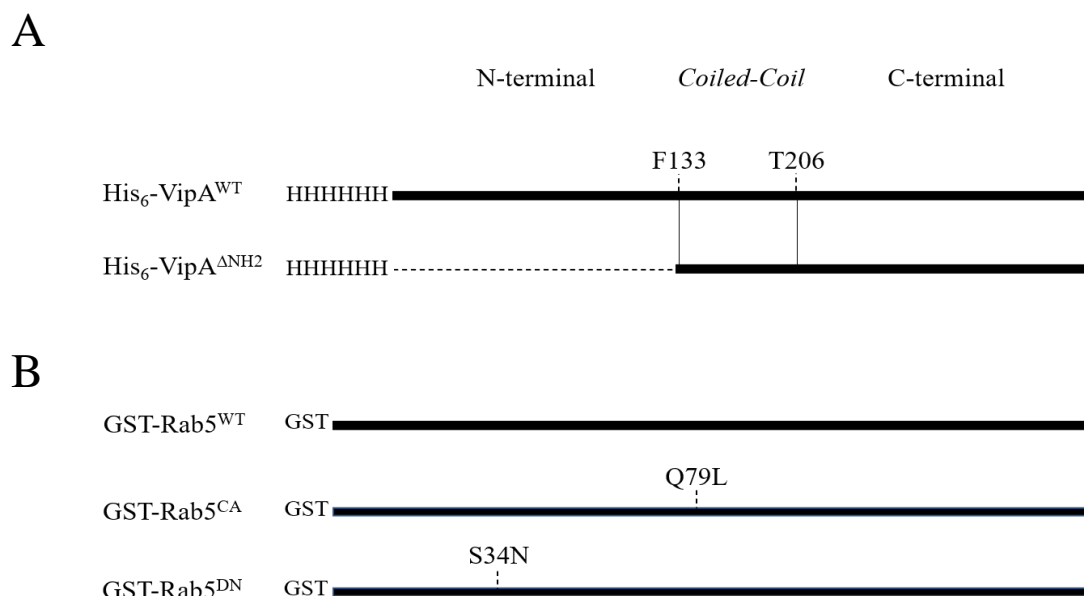


Figura 3.1 - Imagem representativa das sequências das proteínas His₆-VipA, GST-Rab5 e respectivas variantes usadas neste trabalho. (A) His₆-VipA^{WT} e His₆-VipA^{ΔNH2} (aa134-aa339) foram sobreexpressas em *E. coli* BL21 (DE3) e purificadas através de cromatografia de afinidade usando colunas de Ni²⁺-NTA. (B) GST-Rab5^{WT}, GST-Rab5^{CA} (Q79L) e GST-Rab5^{DN} (S34N) foram sobreexpressas em *E. coli* BL21 (DE3) e purificadas através de cromatografia de afinidade usando colunas de glutationa sefarose.

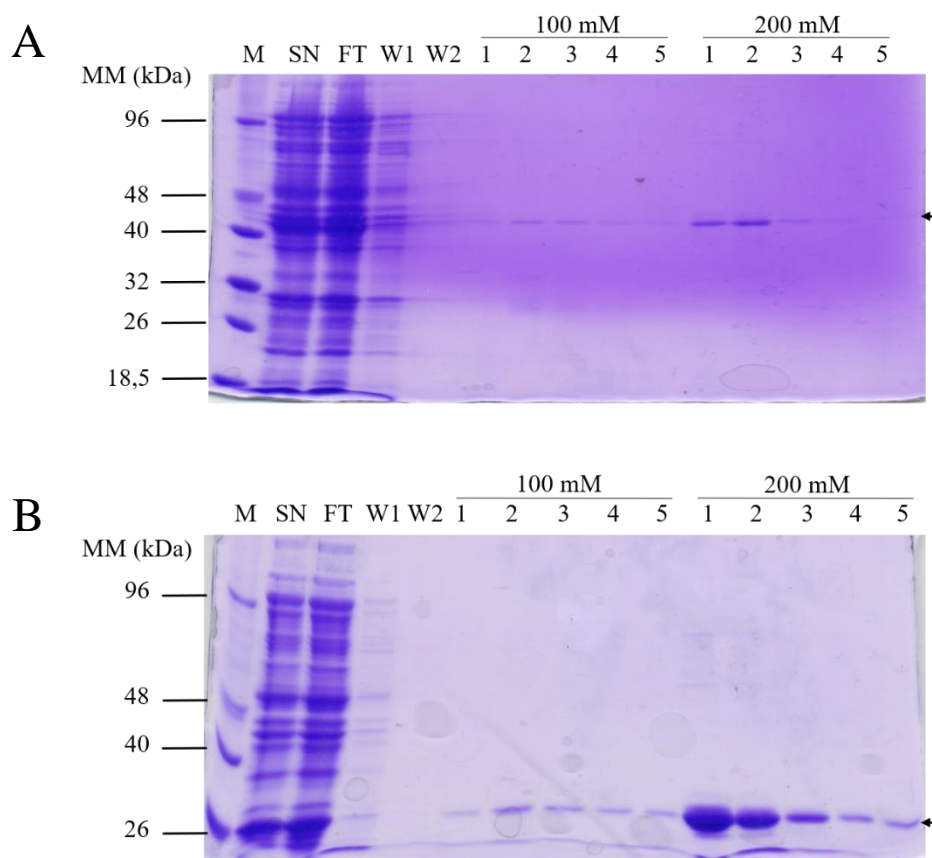


Figura 3.2 - SDS-PAGE das frações obtidas na purificação das proteínas (A) His₆-VipA^{WT} e (B) His₆-VipA^{ΔNH2}. Purificação das proteínas por cromatografia de afinidade através de uma coluna de Ni²⁺-NTA. MM, Massa Molecular; M, Marcador de pesos moleculares; SN, sobrenadante; FT, *flowthrough*; W1-2, lavagens 1 e 2; 1 a 5, eluições com 100 e 200 mM de imidazole. Bandas correspondentes a His₆-VipA^{WT} (40 kDa) e His₆-VipA^{ΔNH2} (24 kDa) encontram-se assinaladas.

As proteínas variantes de VipA (His₆-VipA^{WT} e His₆-VipA^{ΔNH2}) foram purificadas através da sua cauda de histidina (6xHis), por um processo de cromatografia de afinidade IMAC (*Immobilized metal affinity chromatography*). Este sistema é baseado na imobilização das proteínas numa coluna com resina de Ni²⁺-NTA, através da ligação das histidinas aos iões de níquel. A sua posterior eluição é feita pela passagem de soluções com concentrações crescentes de imidazole, que compete com as histidinas pela ligação aos iões níquel. O peso molecular esperado das proteínas recombinantes foi determinado através do *software* SnapGene, obtendo-se os pesos moleculares de ~40,3 kDa e ~25 kDa para His₆-VipA^{WT} e His₆-VipA^{ΔNH2}, respetivamente. Estes resultados estão em concordância com as bandas obtidas nas frações purificadas após SDS-PAGE. No gel correspondente a His₆-VipA^{WT} (**Figura 3.2 A**) verificamos a presença de bandas com um peso molecular de ~40 kDa, nos poços correspondentes à eluição da proteína com 100 mM e 200 mM de imidazole. Relativamente ao gel da His₆-VipA^{ΔNH2} constata-se a presença de bandas de ~26 kDa aquando da eluição da proteína com as mesmas concentrações de imidazole (**Figura 3.2 B**). Adicionalmente, a eluição da proteína ocorre, em ambos os casos,

maioritariamente nas duas primeiras eluições obtidas aquando da passagem do tampão de eluição com 200 mM de imidazole (1 e 2) (**Figura 3.2**).

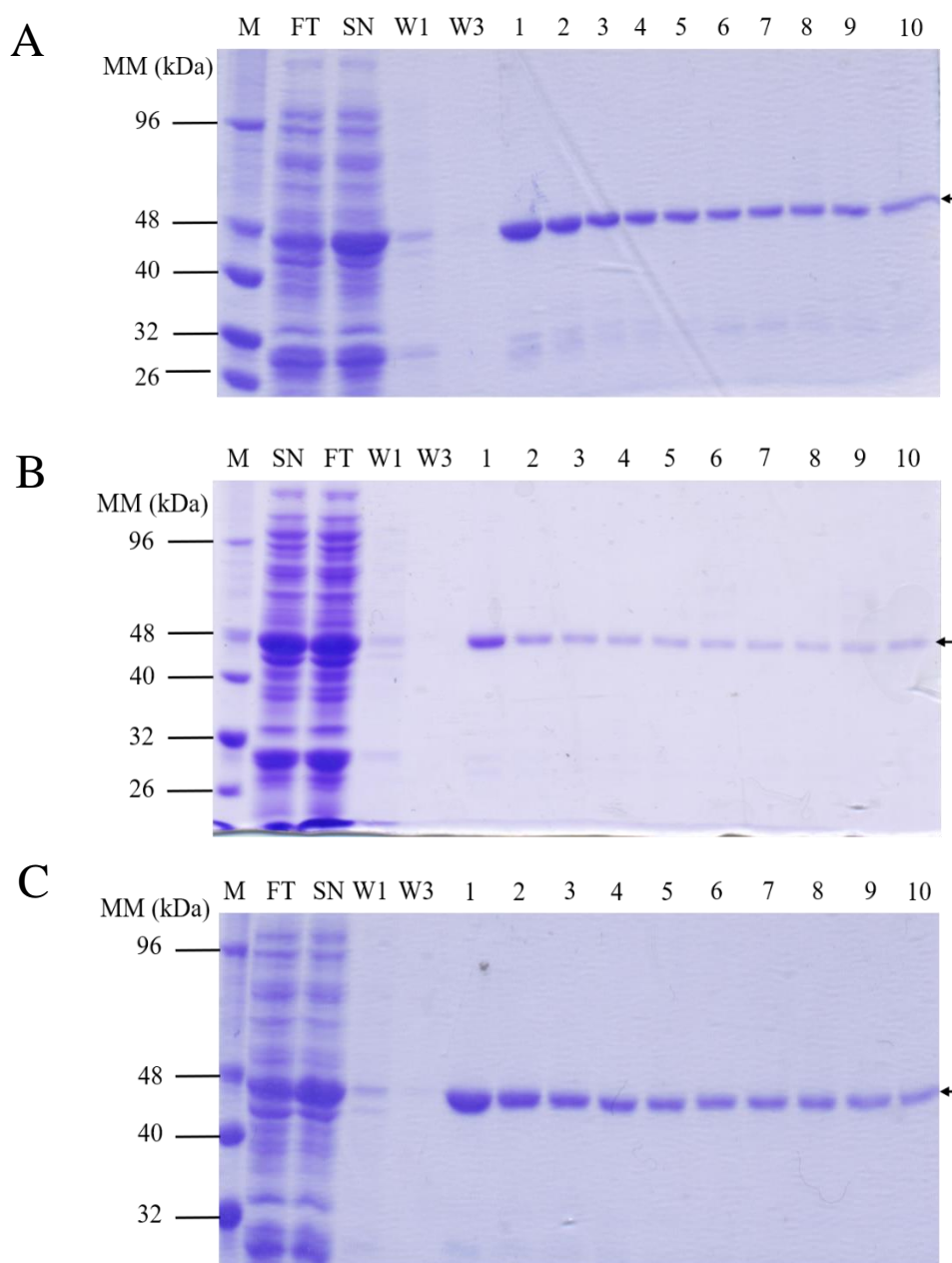


Figura 3.3 - SDS-PAGE das frações obtidas na purificação das proteínas (A) GST-Rab5^{WT}, (B) GST-Rab5^{CA} e (C) GST-Rab5^{DN}. Purificação das proteínas por cromatografia de afinidade através de uma coluna de glutiona sefarose. MM, Massa Molecular; M, Marcador de pesos moleculares; SN, sobrenadante; FT, *flowthrough*; W1-3, lavagens 1 e 3; 1 a 5, eluições com 10 mM de glutiona. Bandas correspondentes a GST-Rab5^{WT}, GST-Rab5^{CA} e GST-Rab5^{DN} (50 kDa) encontram-se assinaladas.

A purificação das proteínas GST-Rab5^{WT}, GST-Rab5^{CA} (Q79L) e GST-Rab5^{DN} (S34N) foi executada através da cauda de GST (Glutathione-S-transferase) também por um processo de cromatografia de afinidade. Neste caso a purificação é feita através de uma ligação do tipo enzima-substrato, dado que a

glutathione, usada na resina de glutathione sepharose da coluna cromatográfica, é um substrato específico de GST. As variantes GST-Rab5^{CA} (conformação “on”) e GST-Rab5^{DN} (conformação “off”) são o resultado de mutações onde o aminoácido glutamina na posição 79 é substituído por uma lisina e o aminoácido de serina na posição 34 é substituído por uma asparagina, respectivamente. Apesar destas alterações, o peso molecular mantém-se praticamente inalterado, visto que a alteração é de 1 único aminoácido.

O peso molecular da proteína Rab5^{WT} e da GST é, respectivamente, de ~ 23,7 e de ~26,4 kDa pelo que a proteína recombinante terá um peso molecular esperado de ~50,1 kDa. Os resultados obtidos nos géis de SDS-PAGE estão em conformidade com este peso molecular total, apresentando bandas com ~48 kDa nos poços correspondentes às eluições de 1 a 10 (**Figura 3.3 A**) com PBS+10 mM de glutathione. O mesmo se verifica para GST-Rab5^{CA} (**Figura 3.3 B**) e GST-Rab5^{DN} (**Figura 3.3 C**).

Em suma, os resultados obtidos na purificação das proteínas His₆-VipA (His₆-VipA^{WT} e His₆-VipA^{ΔNH2}) e GST-Rab5 (GST-Rab5^{WT}, GST-Rab5^{CA} e GST-Rab5^{DN}) foram dentro do esperado.

3.1.2. Ensaio de actina-pireno *in vitro*

De modo a estabelecer se GST-Rab5 e respetivas variantes interferem com a polimerização de actina mediada por His₆-VipA, foram realizados ensaios *in vitro* de actina-pireno. O ensaio bioquímico de actina-pireno tem como base a capacidade de fluorescência do pireno que, uma vez ligado à actina, e aquando da passagem de G-actina para F-actina resulta num aumento da fluorescência para um valor 7-12 vezes superior ao inicial^[47], permitindo assim seguir a polimerização de actina em tempo real através da monitorização da fluorescência emitida a 407 nm. A indução da reação de polimerização obedece a um conjunto de condições, nomeadamente o aumento de força iónica, diminuição do pH e substituição dos iões de Ca²⁺ por Mg²⁺, sendo estas condições proporcionadas pelos diferentes tampões usados ao longo deste procedimento.

Estes ensaios foram realizados na presença de 2,4 μM de actina monomérica (20% pireno-actina) e das proteínas His₆-VipA^{WT}, His₆-VipA^{ΔNH2}, GST-Rab5^{WT}, GST-Rab5^{CA} e GST-Rab5^{DN}. De modo a permitir a polimerização de actina, as amostras foram incubadas com o tampão 10E/1M, induzindo assim a troca do ião Ca²⁺ por Mg²⁺. A fluorescência basal foi medida durante 5 minutos, e após esse período foi induzida a polimerização de actina através do tampão de polimerização KMEI.

Estudos anteriores concluíram que a VipA é um nucleador de actina que atua numa fase inicial da reação de polimerização, aumentando a velocidade inicial do processo^[45]. Nesses estudos, ensaios de actina-pireno efetuados na presença de diferentes concentrações da proteína His₆-VipA^{WT} (50, 100 e 500 nM) mostraram que VipA exercia um efeito máximo a uma concentração mínima de 100 nM. No entanto, nas condições testadas em ensaios preliminares neste trabalho, obteve-se um efeito mais reprodutível e significativo para uma concentração de 500 nM, sendo aqui evidente a função de nucleador de actina

deste efetor (**anexos–Figura A4**). Portanto, a concentração de VipA utilizada nos ensaios ao longo deste trabalho foi de 500 nM.

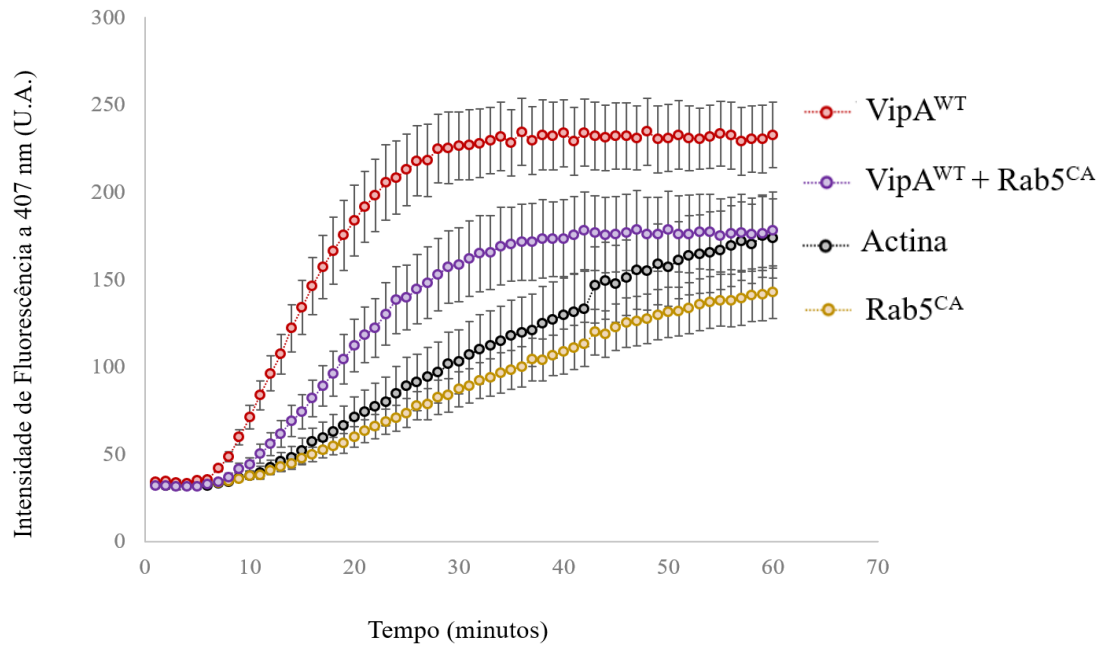
A concentração das diferentes formas de GST-Rab5 foi determinada de modo a que a estequiometria de His₆-VipA:GST-Rab5 fosse de 1:1, evitando possíveis efeitos resultantes de uma diferença nas concentrações das proteínas. Logo, em ensaios posteriores as amostras foram incubadas com 500 nM de GST-Rab5 ou respetivas variantes.

3.1.2.1. GST-Rab5^{CA} inibe a polimerização de actina mediada pela His₆-VipA

A curva relativa à reação de polimerização incubada só com actina, atinge uma intensidade de fluorescência média, ao fim de 60 minutos, de 150 unidades arbitrárias (u.a) (**Figura 3.4 A**), não chegando a atingir o *plateau*. Na presença de 500 nM da proteína His₆-VipA^{WT} verificamos que a velocidade inicial do processo de polimerização de actina (após a adição do tampão de polimerização a $t = 5$ min), aumenta, atingindo o estado estacionário (ou o equilíbrio) mais rapidamente, por volta dos 25 minutos. Isto acontece provavelmente devido a um equilíbrio da adição e dissociação de monómeros de actina nas extremidades, não ocorrendo variação da massa total de filamentos^[35]. Estes dados corroboram a capacidade de nucleador de VipA, observados em trabalhos anteriores^{[44][45]}. Por outro lado, quando se adiciona apenas GST-Rab5^{CA} (variante incapaz de hidrolisar GTP) na mesma concentração (500 nM), o efeito provocado na polimerização de actina parece não ser significativo em comparação com a curva de actina, tendo em conta o erro calculado. Similarmente à curva de actina, a fase de equilíbrio também não foi atingida, ao fim de 60 minutos. Contudo, quando as amostras de actina são incubadas com 500 nM de ambas as proteínas (razão equimolar His₆-VipA^{WT}- GST-Rab5^{CA}) verifica-se uma descida significativa na velocidade inicial de polimerização de actina, evidenciada pela diminuição do declive quando comparado com curva de polimerização correspondente à amostra incubada apenas com His₆-VipA^{WT}. Adicionalmente, o *plateau* é atingido mais tarde, por volta dos 30 minutos, e a fluorescência máxima obtida é menor, apresentando um valor de ~170 u.a. Estes resultados parecem apontar então para um efeito inibitório de Rab5^{CA} (Rab5 na sua forma “on”) sobre a capacidade nucleadora de His₆-VipA na polimerização de actina.

A região N-terminal (aa1-aa133) do efetor de *L. pneumophila*, VipA é a região essencial à interação desta com a GTPase Rab5. Este facto foi comprovado em estudos anteriores através de ensaios de co-imunoprecipitação, onde se verificou a capacidade de GFP-Rab5 precipitar VipA^{WT}-myc, mas não a forma sem a região N-terminal, VipA^{ΔNH2}-myc (Franco *et al.*, não publicado). Deste modo, e de forma a comprovar se a interação VipA-Rab5 é a responsável pela inibição da polimerização de actina observada acima, foram realizados ensaios de actina-pireno na presença de His₆-VipA^{ΔNH2}.

A



B

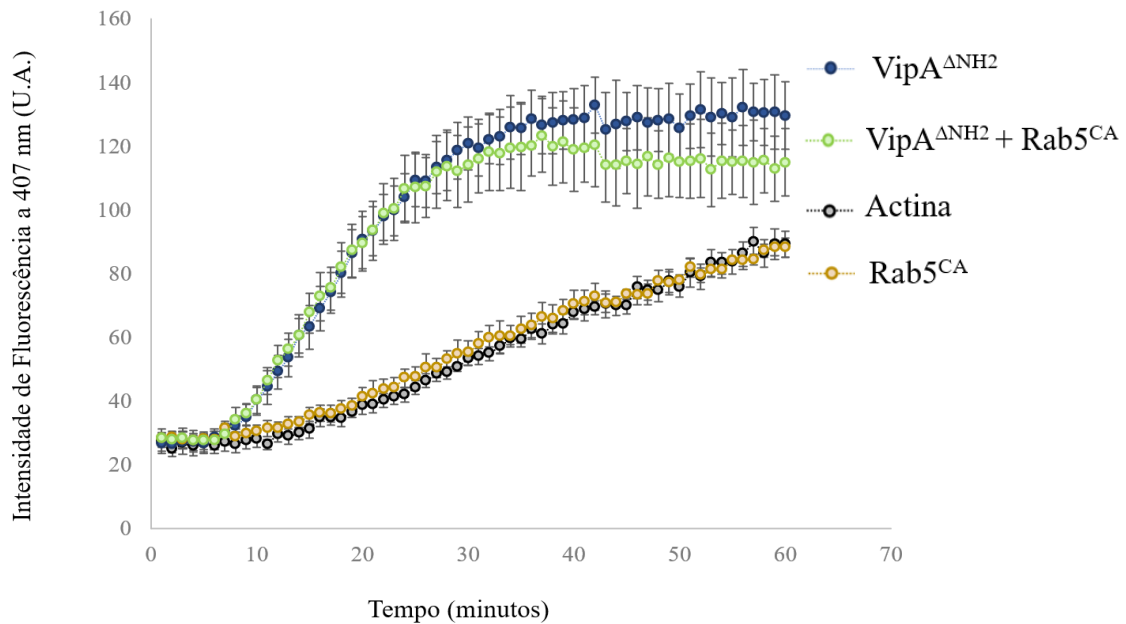


Figura 3.4 - GST-Rab5^{CA} inibe a polimerização de actina mediada por His₆-VipA. Ensaios de polimerização de actina, *in vitro*, foram realizados na presença de 2,4 μM de actina monomérica (20% de pireno-actina) e His₆-VipA^{WT}, His₆-VipA^{ΔNH2} e GST-Rab5^{CA}. Os valores de fluorescência (expressos em Unidades Arbitrárias, U.A.) foram recolhidos a 407 nm após a excitação a 365 nm e medidos após a indução de polimerização (a $t = 5$ min). Em (A) e (B) as amostras foram pré-incubadas com 500 nM de His₆-VipA^{WT} e His₆-VipA^{ΔNH2}, respetivamente, e com 500 nM de GST-Rab5^{CA}. Curvas correspondem à média de 6 ensaios independentes (A) ou 3 ensaios independentes (B). Barras de erro representam o erro padrão da média.

No caso da curva de polimerização da amostra incubada apenas com GST-Rab5^{CA} (**Figura 3.4 B**), evidencia-se novamente a ausência de efeito no processo de polimerização por parte desta proteína, denotando-se uma sobreposição com a curva de actina. Igualmente aos ensaios realizados na presença de His₆-VipA^{WT} (**Figura 3.4 A**), His₆-VipA^{ΔNH2} mantém a capacidade de aumentar a velocidade de polimerização de actina na fase inicial do processo. No entanto, a intensidade de fluorescência final apresenta, em média, um valor de ~ 130 u.a (**Figura 3.4 B**), 2 vezes menor que o observado aquando da polimerização mediada pela His₆-VipA^{WT}. Esta menor atividade por parte de His₆-VipA^{ΔNH2}, traduzida por uma intensidade de fluorescência máxima menor quando comparada com His₆-VipA^{WT}, vai de encontro aos resultados do estudo de Bugalhão *et al.*, 2016^[44]. Em contraste, observa-se que a adição de GST-Rab5^{CA} não tem efeito na polimerização causada por His₆-VipA^{ΔNH2}, uma vez que a curva obtida aquando da incubação com His₆-VipA^{ΔNH2} é idêntica à curva obtida com His₆-VipA^{ΔNH2} e GST-Rab5^{CA}, tendo em conta os erros calculados. Ao mesmo tempo, o equilíbrio de ambas as curvas (His₆-VipA^{ΔNH2}, e His₆-VipA^{ΔNH2} e GST-Rab5^{CA}) é simultaneamente atingido aos 25 minutos. Portanto, a interação VipA-Rab5 parece ser a responsável pela inibição de polimerização de actina, visto que quando se elimina a extremidade N-terminal de VipA (responsável pela interação VipA-Rab5) esse efeito desaparece.

Ensaio de actina-pireno foram realizados também na presença de 500 nM da forma inativa de GST-Rab5 (GST-Rab5^{DN}) (**Figura 3.5 A**). A incubação desta forma com a actina parece não ter qualquer efeito na polimerização de actina e o equilíbrio não chega a ser atingido, como o constatado aquando da incubação da actina com a forma ativa de Rab5 (GST-Rab5^{CA}). A função de His₆-VipA^{WT} (500 nM) é mais uma vez verificada, denotando-se um aumento da velocidade inicial do processo de polimerização, quando comparada com a curva da actina, atingido o equilíbrio aos 25 minutos e uma intensidade de fluorescência máxima de ~140 u.a. Todavia, ao contrário do efeito observado na **figura 3.4 A**, torna-se óbvio que GST-Rab5^{DN}, quando incubado na presença de His₆-VipA^{WT} e da actina, não inibe a polimerização de actina, havendo uma sobreposição com a curva correspondente à incubação de His₆-VipA^{WT}, e atingindo uma intensidade máxima de fluorescência igual. Em termos conclusivos, estes ensaios e os realizados com GST-Rab5^{CA} parecem apontar para a necessidade da ativação da proteína Rab5, para inibição parcial da polimerização de actina mediada por VipA.

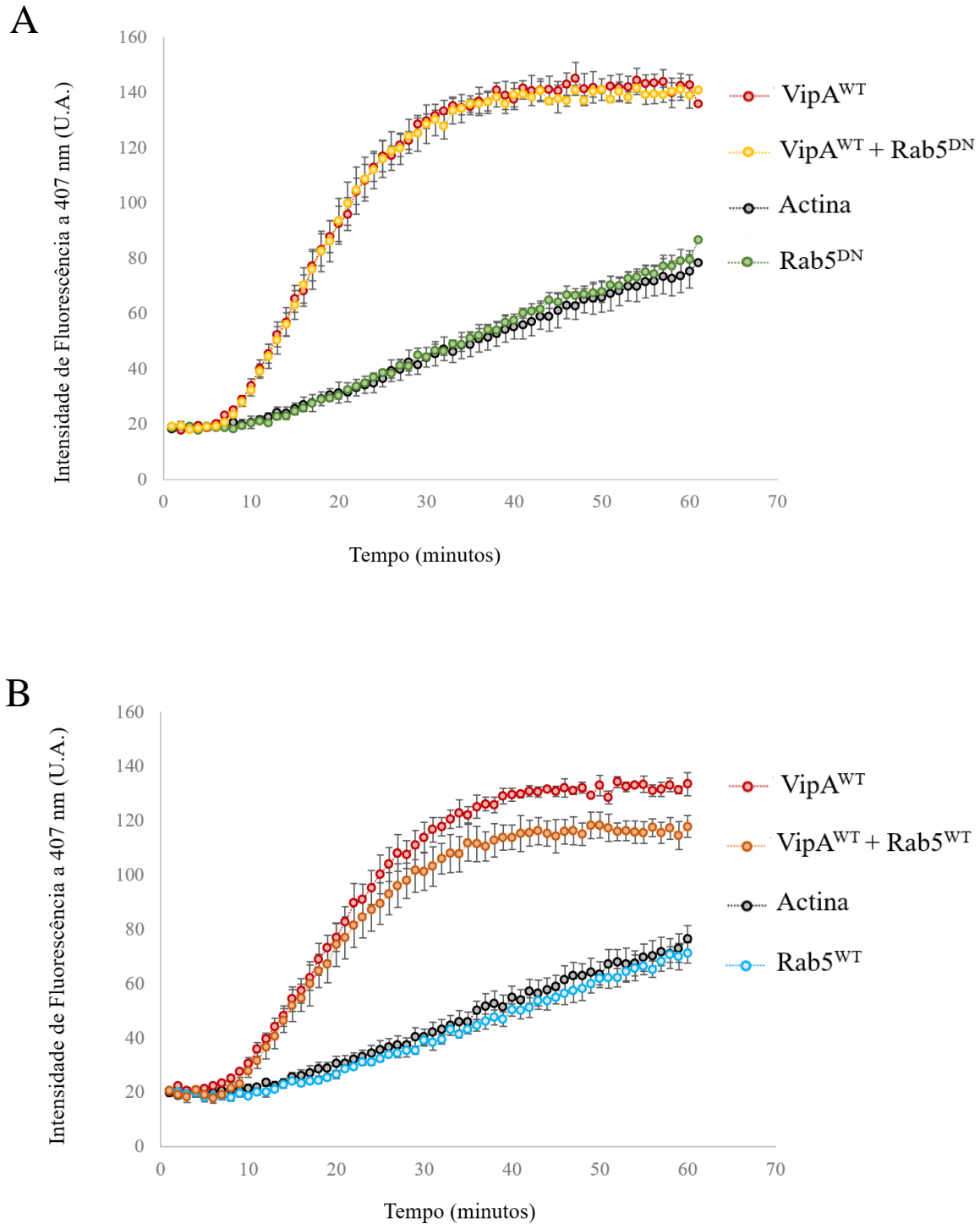


Figura 3.5 – Interferência de GST-Rab5^{WT} e GST-Rab5^{DN} na polimerização de actina mediada por His₆-VipA. Ensaios de polimerização de actina *in vitro* foram realizados na presença de 2,4 μ M de actina monomérica (20% de pireno-actina) e His₆-VipA^{WT}, GST-Rab5^{WT} e GST-Rab5^{DN}. Os valores de fluorescência (expressos em Unidades Arbitrárias, U.A.) foram recolhidos a 407 nm após a excitação a 365 nm e medidos após a indução de polimerização (a $t = 5$ min). Em (A) e (B) as amostras foram pré-incubadas com 500 nM de His₆-VipA^{WT} e com 500 nM da GST-Rab5^{DN} ou GST-Rab5^{WT}, respetivamente. Curvas correspondem à média de 3 ensaios independentes em (A) e (B). As intensidades de fluorescência foram normalizadas pelo valor obtido aquando da subtração da média dos primeiros 5 valores de intensidade de fluorescência da actina pela média dos primeiros 5 valores de intensidade obtidos aquando da adição de cada proteína. Barras de erro representam o erro padrão da média.

Os últimos ensaios de actina-pireno foram efetuados com a forma “selvagem” da proteína GST-Rab5 (GST-Rab5^{WT}), que se encontra maioritariamente na conformação que se liga a GDP (conformação “*off*”)^[48].

As amostras foram incubadas com 500 nM de GST-Rab5^{WT} (**Figura 3.5 B**). As curvas correspondentes às amostras incubadas com actina e GST-Rab5^{WT} ou apenas com actina, apresentam perfis semelhantes, parecendo sobrepor-se, tal qual com o observado nas curvas correspondentes à incubação de actina com as formas de Rab5 referidas acima. A incubação da actina com His₆-VipA^{WT}, mais uma vez aumenta a taxa de polimerização na fase inicial da reação, sendo atingida uma intensidade máxima de fluorescência de 140 u.a. Esta divergência no valor da intensidade máxima de fluorescência, aquando da incubação com apenas His₆-VipA^{WT}, com o valor atingido nos ensaios acima referidos (**Figura 3.4 A**), pode dever-se a uma sobrestimação da concentração inicial de actina, resultando num menor número de monómeros de actina na solução.

A curva obtida aquando da incubação com GST-Rab5^{WT} e His₆-VipA^{WT} (**Figura 3.5 B**), por outro lado, é caracterizada por uma intensidade máxima de fluorescência abaixo da obtida com apenas His₆-VipA^{WT}, apresentando um valor de fluorescência de ~120 u.a. De facto, quando comparamos estas duas curvas, verificamos que, desde o momento de indução da polimerização até aos 20 minutos, estas apresentam um perfil semelhante, sobrepondo-se. Contrariamente, a partir dos 20 minutos denota-se uma discrepância da curva incubada com as duas proteínas *versus* à curva com apenas VipA na sua forma selvagem. Assim, estes resultados parecem apontar para um efeito de inibição da polimerização de actina mediada por VipA por GST-Rab5^{WT}, que se inicia numa fase mais tardia na reação de polimerização. Uma primeira hipótese que procura explicar este efeito, baseia-se no facto de GST-Rab5^{WT} não se encontrar na sua totalidade na conformação “*off*”, pelo que a presença de moléculas de Rab5 na sua forma ativa provocam um efeito menor de inibição da polimerização de actina. De forma a comprovar este facto, seria necessário realizar estes ensaios na presença de Rab5 carregada com GTPγS (Rab5^{WT}-GTPγS), um substrato análogo ao GTP não hidrolisável, e verificar se a curva correspondente à incubação com GST-Rab5^{WT} e His₆-VipA^{WT} seria alterada, adotando um perfil semelhante ao manifestado na incubação com GST-Rab5^{CA} e His₆-VipA^{WT}. Outra alternativa complementar que poderia explicar esta diminuição na curva correspondente a GST-Rab5^{WT} e His₆-VipA^{WT}, seria se a Rab5 demonstrasse a capacidade de interferir no comprimento dos filamentos de actina aquando da polimerização de actina mediada por VipA^[49], resultando num menor filamento e por isso numa intensidade de fluorescência máxima menor.

3.2. Interação VipA-Rab5 em contexto de infeção em macrófagos

Ensaio precedentes de imunofluorescência, demonstraram em células epiteliais que sobreexpressavam EGFP-Rab5 uma co-localização com VipA-myc transfetada. Assim, de forma a determinar a presença

de interação entre a proteína efetora VipA e a proteína endógena Rab5, em macrófagos, procurou-se observar a co-localização por microscopia e efetuar ensaios de co-imunoprecipitação.

3.2.1. 3xFLAG-VipA co-localiza com Rab5 eucariótica endógena

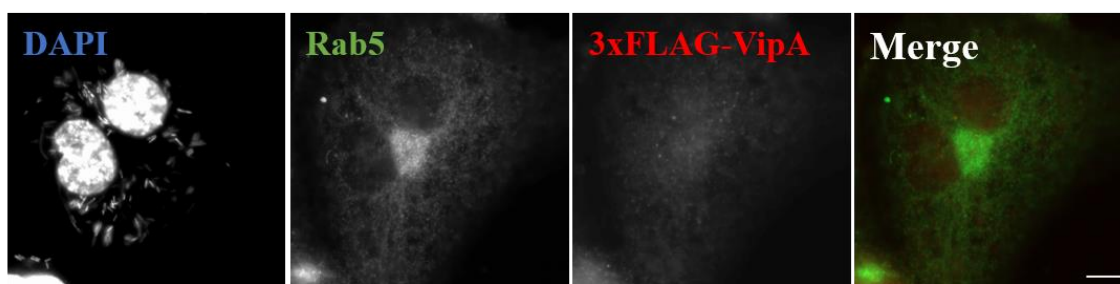
A co-localização de 3xFLAG-VipA com Rab5 eucariótica endógena foi observada por microscopia, em contexto de infecção. Através deste ensaio foi estabelecido o tempo ideal após-infecção no qual esta co-localização seria mais evidente, de modo a realizar ensaios de co-imunoprecipitação.

Deste modo, macrófagos foram infectados com MOIs de 250 e 500 de duas estirpes de *L. pneumophila*, LPIF159 e LPIF160 (**Tabela 2.1**). Na estirpe LPIF159 o gene *vipA* encontra-se deletado, sendo a forma recombinante 3xFLAG-VipA sobreexpressa sob o controlo de um promotor indutível por IPTG (P_{tac}). Por outro lado, na estirpe LPIF160 o gene *dotA* foi deletado. Este codifica uma proteína transmembranar essencial ao sistema de secreção do tipo IVB^[50], sendo mutantes *dotA* frequentemente usados como controlo negativo para secreção por este sistema. Após a infecção, as células foram fixadas com 4% de PFA em diferentes tempos: 2, 5 e 8 horas. As células sofreram posterior marcação, onde a VipA foi detetada com o anticorpo anti-FLAG (e o anticorpo secundário anti-ratinho conjugado com o fluoróforo Alexa Fluor 594), a Rab5 com o anticorpo anti-Rab5 (e o anticorpo secundário anti-cabra conjugado com o fluoróforo Alexa Fluor 488), e as bactérias e os núcleos (DNA) com DAPI.

A proteína VipA apresentava-se em forma de pontos com uma localização geralmente citoplasmática em todos os tempos de fixação, no entanto, às 2h pós-infecção (P.I.) aparentava ocorrer uma acumulação da proteína na periferia de algumas células (**Figura 3.6**). Este efeito, embora presente às 5h, não era tão evidente. Às 8h, a presença da proteína efetora estava ausente na periferia. A proteína Rab5 endógena, por outro lado, encontrava-se distribuída por toda a célula, exibindo uma co-localização com VipA em alguns pontos, essencialmente às 2h. Às 5h e 8h, esta co-localização não se visualizava de forma tão predominante.

Tendo em conta estas observações o tempo de após-infecção definido para ensaios posteriores de translocação e co-imunoprecipitação foi de 2h. É de notar, no entanto, que a marcação com o anticorpo anti-Rab5 resultou num efeito de *background* elevado, não sendo por isso sempre fiável a visualização de Rab5. Este efeito pode dever-se a várias razões, por exemplo à reatividade cruzada do anticorpo secundário resultando em ligações não específicas, o agente usado na reação de fixação, e uma ineficiência no bloqueio dos potenciais locais de ligação não específica. De forma a corrigir estes possíveis problemas, ensaios adicionais teriam de ser realizados, procurando, por exemplo, substituir o PFA por outro agente de fixação, ou o soro de cavalo usado no bloqueio por soro do hospedeiro do anticorpo secundário (soro de bovino).

$\Delta dotA$ 3xFLAG-VipA



3xFLAG-VipA

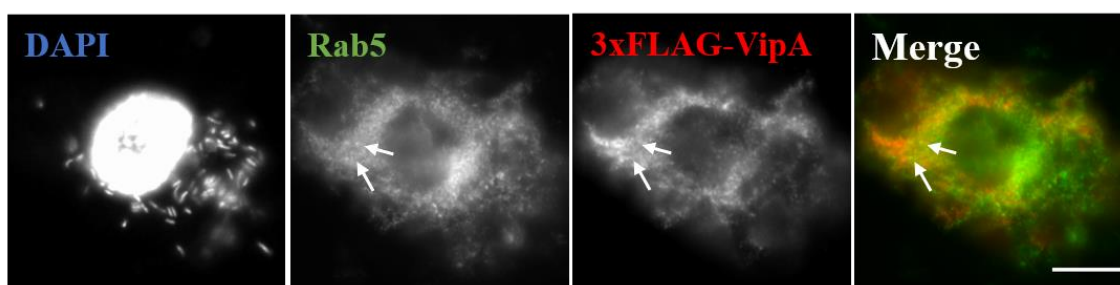


Figura 3.6 – Co-localização de 3xFLAG-VipA com Rab5 endógena em macrófagos. Células THP-1 foram infectadas com estirpes de *L. pneumophila* que sobreexpressam 3xFLAG-VipA, sendo uma proficiente na sua secreção (LPIF159) e a outra deficiente (mutante *dotA*, LPIF160), com uma MOI de 500, e posteriormente fixadas com 4% PFA, a um tempo após-infecção (TPI) de 2h. A proteína VipA está ligada a uma cauda de 3xFLAG, permitindo a sua deteção com um anticorpo primário anti-FLAG e um secundário ligado ao fluoróforo Alexa Fluor 594 anti-ratinho (a vermelho). A proteína Rab5 encontra-se marcada com o anticorpo anti-Rab5 e correspondente anticorpo secundário anti-cabra ligado ao fluoróforo Alexa Fluor 488 (a verde). Os núcleos e as bactérias foram marcados com o fluoróforo DAPI. À direita, as imagens Merge apresentam a sobreposição dos canais correspondentes a VipA e Rab5. Os locais onde é observada co-localização estão assinalados com setas brancas. As imagens apresentadas são imagens representativas e foram recolhidas através de um microscópio Zeiss AxioImager D2. Barras de escala, 8 μ m.

3.2.2. Ensaios de translocação de 4xHA-VipA para o citosol de macrófagos

De forma a confirmar a interação VipA-Rab5 em contexto de infeção em macrófagos, ensaios de co-imunoprecipitação teriam de ser realizados. Nestes ensaios, a proteína 4xHA-VipA seria precipitada, através de *beads* que ligam à cauda de 4xHA, sendo posteriormente verificada a presença desta proteína e de Rab5, por *immunoblot*. Antes da realização destes ensaios é essencial, no entanto, estabelecer se o método bioquímico usado na lise celular é o adequado para confirmação da translocação da proteína recombinante VipA para o citosol dos macrófagos, não se devendo a presença desta proteína à lise bacteriana ou outro artefacto. Para este efeito, ensaios de translocação foram efetuados onde macrófagos foram infectados com as estirpes LPIF145 (que expressa 4xHA-VipA e GFP) e LPIF146 (que expressa apenas GFP), com uma MOI de 100, durante 2 horas. Após este período, as células infectadas foram lisadas com o tampão de lise (tampão Co-IP com 0,1% do detergente NP-40) e o *pellet* e sobrenadante foram recolhidos (**Figura 3.7**). As amostras foram preparadas para análise por *immunoblot*. Ambas as estirpes apresentam na sua constituição um plasmídeo que expressa GFP, uma proteína que não apresenta o sinal de translocação frequentemente encontrado em efetores do sistema de secreção do tipo

IVB, não sendo por isso translocada para o citosol dos macrófagos e permanecendo no interior das bactérias. Assim, esta proteína serve de controlo, pelo que será esperado observar a presença de banda apenas no poço correspondente à amostra de *pellet*.

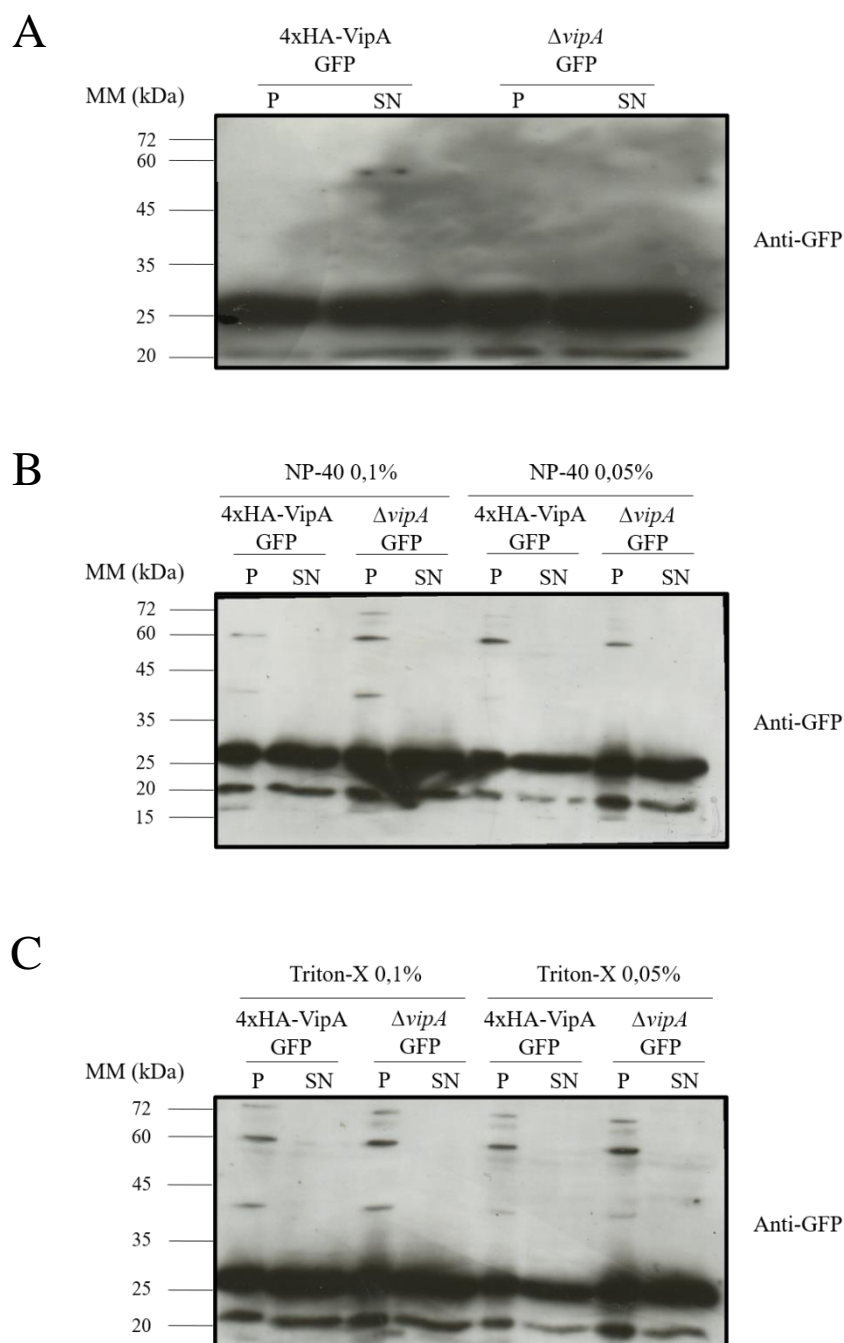


Figura 3.7 - A proteína controlo GFP permanece no sobrenadante. Células THP-1 foram infetadas com estirpes de *L. pneumophila* cujo gene *vipA* foi deletado, sobreexpressando 4xHA-VipA e GFP (LPIF145) ou apenas GFP (LPIF146), com uma MOI de 100, durante 2 horas. As células infetadas foram lisadas através da incubação com um tampão com (A) 0,1% de NP-40, (B) 0,1% ou 0,05% do detergente NP-40 ou com (C) 0,1% ou 0,05% de Triton-X. Análise por *immunoblot* com o anticorpo anti-GFP e respetivo anticorpo secundário conjugado a HRP. MM, Massa Molecular; P, *pellet*; SN, sobrenadante.

A observação do *immunoblot* da **figura 3.7 A** aponta para a presença de banda com o peso molecular de GFP (~27 kDa) não só nos poços correspondentes ao *pellet*, como nos correspondentes aos do sobrenadante, de ambas as estirpes, contrariamente ao esperado. Perante este facto, podemos colocar a hipótese de uma provável lise bacteriana. Tendo isto em conta, foram efetuadas alterações no procedimento, nomeadamente no detergente e nas centrifugações realizadas. O procedimento acima foi repetido, no entanto, foi realizada apenas uma centrifugação recolhendo-se imediatamente a fração de *pellet* e sobrenadante. Adicionalmente, foram usados tampões de lise com diferentes tipos e concentrações de detergentes, nomeadamente foi repetida a lise com 0,1% e com 0,05% de NP-40 e de Triton-X. Na **figura 3.7** em B e C, observa-se que os resultados obtidos, apesar destas alterações, foram semelhantes aos verificados anteriormente, isto é, a banda correspondente a GFP continua a ser detetada na amostra correspondente ao sobrenadante tanto no *immunoblot* B, como no C. Adicionalmente, em todos os *immunoblots* estão presentes bandas adicionais, acima ou abaixo da banda correspondente à GFP. Estas bandas podem resultar na ligação não específica do anticorpo secundário.

É necessário considerar ainda que a presença de GFP no sobrenadante pode resultar na translocação da proteína apesar da ausência do sinal de translocação.

De forma a descartar uma possível lise bacteriana, o procedimento acima foi repetido, agora na ausência de macrófagos. Assim, $1,5 \times 10^8$ bactérias da estirpe LPIF145 (número de bactérias usadas nas infeções aquando dos ensaios de translocação) foram incubadas em diferentes tampões de lise (0,05% de Triton-X; ou 10% Glicerol com 0,05% NP-40; ou 10% Glicerol com 0,05% de saponina), sendo realizado posteriormente diluições seriadas (**Figura 3.8**). As últimas 3 diluições foram plaqueadas em placas CYE. A escolha de detergentes foi baseada em ensaios realizados em estudos prévios onde os autores recorreram a estes detergentes para lisar células, sem que houvesse comprometimento das bactérias de *L. pneumophila*^{[51][52]}.

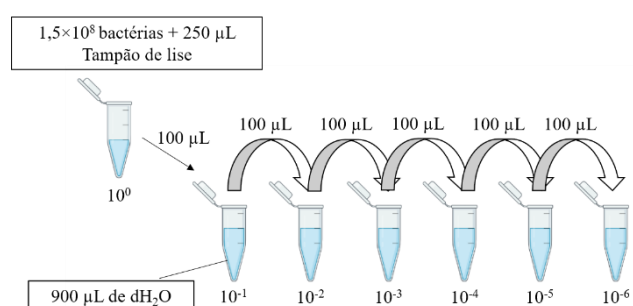


Figura 3.8 - Esquema representativo da diluição seriada realizada aquando da incubação de bactérias em tampões de lise com diferentes constituições. O total de $1,5 \times 10^8$ bactérias usadas nos ensaios de translocação foram incubadas, durante 10 minutos, com tampões de lise de diferentes constituições, realizando-se subsequentemente uma diluição seriada. Foram transferidos 100 µL do tubo correspondente à diluição 10^0 , onde as bactérias foram inicialmente inoculadas, para o tubo da diluição 10^{-1} , no qual foi efetuada a adição prévia de 900 µL de dH₂O. Após homogeneização, foram transferidos 100 µL do tubo correspondente à diluição 10^{-1} para o tubo 10^{-2} . Este processo foi repetido até à diluição 10^{-6} .

O número de colónias obtido em cada diluição, nos diferentes tampões de lise, encontra-se apresentado na tabela abaixo (**Tabela 3.1**). Tal como esperado, o número de colónias diminui progressivamente com o aumento da diluição efetuada. Adicionalmente, ao compararmos o número de colónias entre os dois estados de incubação (com e sem detergente), obtidas na diluição 10^{-4} , verificamos que a incubação com 0,05% de Triton-X resulta num número de colónias cerca de cinco vezes inferior ao obtido na ausência do detergente. Estes resultados apontam para uma menor integridade desta estirpe na presença do detergente, traduzida no menor número de colónias formadas, o que pode ser indicativo de uma possível lise das bactérias na presença de Triton-X. Por outro lado, a incubação com 10% glicerol no tampão de Co-IP resultou num número de colónias igual a 20, na diluição 10^{-4} (**Tabela 3.1 B**). Aquando da adição de 0,05 % do detergente NP-40 o número de colónias formadas foi semelhante ao controlo, não parecendo por isso afetar a integridade das bactérias. Paralelamente, a adição de 0,05% de saponina parece também não afetar a viabilidade de *L. pneumophila*, resultando num número de colónias duas vezes superior ao controlo. A comparação das outras diluições, 10^{-5} e 10^{-6} , apresentam uma diferença equiparável.

Tabela 3.1 – Número de colónias da estirpe LPIF145 (4xHA-VipA GFP) obtidas aquando da incubação com o tampão de lise, ou seja, tampão Co-IP na presença de (A) 0,05% de Triton-X e na presença de (B) 10% de glicerol com 0,05% de NP-40 ou 0,05% de saponina.

A

Diluição	Tampão Co-IP com 0,05% Triton-X	Tampão Co-IP sem detergente
10^{-4}	59	280
10^{-5}	8	29
10^{-6}	2	3

B

Diluição	Tampão Co-IP + 10% Glicerol com 0,05% NP-40	Tampão Co-IP + 10% Glicerol com 0,05% saponina	Tampão Co-IP + 10% Glicerol	dH ₂ O Estéril
10^{-4}	21	42	20	~242
10^{-5}	1	6	1	71
10^{-6}	0	0	0	8

As bactérias foram também incubadas apenas em água estéril como controlo, à temperatura ambiente, apresentando um número de colónias superior ao obtido aquando da incubação com os tampões de lise apresentados. Tendo estes resultados em vista, a incubação nestas últimas condições experimentais seriam talvez as melhores, uma vez que não parece afetar a integridade de *L. pneumophila*. No entanto, a lise celular nos ensaios de translocação e co-imunoprecipitação necessitam de uma incubação no gelo, uma vez que é indispensável a inativação de proteases.

Tendo em conta os dados apresentados, e não tendo havido tempo para otimizar as condições adequadas às experiências de Co-IP (nomeadamente impedindo a lise bacteriana), não foi possível levar a cabo estes ensaios.

3.3. Localização de P_{tac}-3xFLAG-VipA e P_{vipA}-4xHA-VipA em macrófagos

3.3.1. Construção do plasmídeo pJS1 e formação da estirpe LPJS1

A estirpe de *L. pneumophila* LPIF159 sobreexpressa 3xFLAG-VipA sob o controlo do promotor tac (P_{tac}), um promotor indutível que resulta na combinação dos promotores lacUV5 e trp, que permite o controlo da expressão através da adição do substrato IPTG. Na natureza, no entanto, a expressão da proteína VipA encontra-se sob o controlo do promotor natural da bactéria (referido daqui para a frente como P_{vipA}), que induz a expressão de proteína como resposta a estímulos do ambiente. De forma a comparar a localização da proteína VipA, quando expressa sob o controlo do promotor tac, *versus* do promotor natural (que controla a expressão de VipA), foi necessário primeiro construir um plasmídeo denominado pJS1 (P_{vipA}-4xHA-VipA), onde o promotor P_{tac} foi substituído pelo promotor P_{vipA}. Este plasmídeo foi introduzido por transformação na estirpe de *L. pneumophila* LPIF03, cujo gene *vipA* se encontra deletado, originando a estirpe LPJS1. A expressão da proteína 4xHA-VipA na estirpe resultante foi confirmada por *immunoblot* (**anexos-Figura A5**).

3.3.2. A proteína translocada 3xFLAG-VipA expressa a partir do promotor P_{tac} apresenta uma localização citoplasmática e co-localiza com actina

De seguida, a localização da 3xFLAG-VipA (sob controlo de P_{tac}) e de 4xHA-VipA (sob controlo de P_{vipA}) foi analisada e comparada por microscopia. Para isto, macrófagos foram infetados com as estirpes LPIF159, LPJS1 e a estirpe controlo LPIF03, com uma MOI de 500, e as células infetadas subsequentemente fixadas com 4% de PFA, a tempos após-infecção de 2, 4, 6 e 8 horas. Para marcação da proteína VipA (a verde), foram usados os anticorpos primários anti-FLAG (LPIF03; LPIF159) e anti-HA (LPJS1), bem como os respetivos anticorpos secundários Alexa Fluor 488 anti-ratinho e anti-ratazana, respetivamente. Os filamentos de actina (a vermelho), por sua vez, foram marcados através do uso do marcador de F-actina faloidina, ligado ao fluoróforo Alexa Fluor 594.

A estirpe controlo, LPIF03, onde o gene *vipA* foi deletado, é caracterizada pela ausência de fluorescência correspondente à proteína estudada, sendo o efeito demonstrado no primeiro painel da **figura 3.9**, às 2h, semelhante ao observado aos TPIs de 4, 6 e 8h.

A presença de P_{tac} -3xFLAG-VipA (LPIF159) é constante às 2, 4, 6 e 8h (**Figura 3.9, terceiro painel**). Esta apresenta-se sob a forma de pontos com uma localização geralmente citoplasmática, tendo sido observada também uma acumulação da mesma na periferia de algumas células. Estes resultados corroboram o observado nos ensaios realizados aquando da co-localização com Rab5, descritos anteriormente. Adicionalmente, os filamentos de actina foram também marcados, e a localização de VipA em relação a estes, observada. Às 2h e 4h os filamentos de actina encontram-se rodeadas por VipA, apresentando co-localização entre estas duas proteínas em alguns pontos. Ademais, nestes mesmos TPIs, as células apresentavam frequentemente extensões membranares ricas em actina, onde simultaneamente se podia também observar a presença de VipA. Às 6h e 8h, a presença de filamentos de actina rodeados de VipA não é tão predominante, embora alguma co-localização com a actina continue a ser observada. De igual forma, estudos anteriores demonstraram que VipA quando ectopicamente expressa em levedura e em células de mamífero apresentava co-localização com F-actina^{[44][45]}. A proteína 4xHA-VipA, expressa sob o controlo do promotor P_{vipA} , permaneceu ausente nos distintos tempos de fixação observados, sendo o efeito constatado semelhante ao da **figura 3.9, painel dois**. Este efeito pode ser explicado pelo facto de P_{vipA} , sendo o promotor original da bactéria, induzir a expressão da proteína consoante a necessidade da bactéria e do ambiente onde a mesma se encontra, contrariamente à 3xFLAG-VipA, expressa sob o controlo do promotor tac , um promotor forte sintético indutível, cuja função é maximizar a expressão da proteína que controla. Assim, a ausência de sinal pode ser traduzida na possível expressão da proteína a tempos de infeção mais prematuros ou tardios. Tendo em conta as características de P_{vipA} , outro fator que pode explicar a ausência de 4xHA-VipA é a MOI utilizada, uma vez que uma MOI baixa pode resultar na ausência de proteína suficiente para produção de um sinal significativo. Deste modo, o ideal seria a realização de ensaios de imunofluorescência adicionais, com uma maior gama de TPIs e uma infeção realizada com uma MOI superior a 500. É necessário ter em conta, no entanto, a própria desvantagem do procedimento utilizado. Este baseia-se na observação das células infetadas fixadas a determinados tempos após-infeção, não sendo por isso visualizado o processo contínuo e ao longo do tempo (*real-time*).

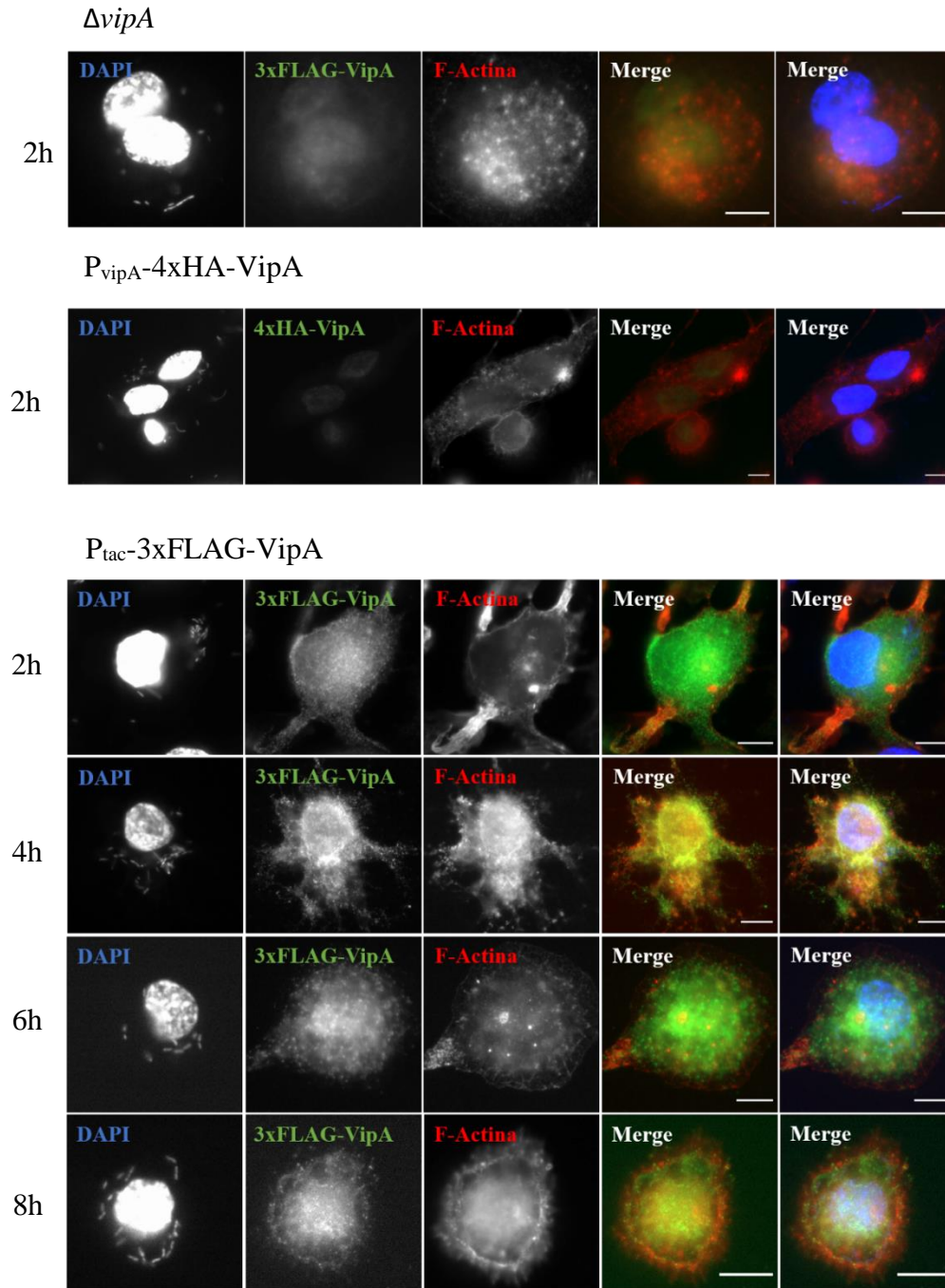


Figura 3.9 - Localização da *P_{tac}*-3xFLAG-VipA e *P_{vipA}*-4xHA-VipA em macrófagos e co-localização com F-actina. Macrófagos foram infectados com as estirpes de *L. pneumophila*: LPIF03 cujo gene *vipA* foi deletado; LPIF159 que sobreexpressa 3xFLAG-VipA sob o controle do promotor *tac* (*P_{tac}*); e LPJS1 que sobreexpressa 4xHA-VipA sob o controle do promotor natural da bactéria (*P_{vipA}*). Foi utilizada uma MOI de 500 e as células infectadas foram fixadas com 4% PFA, a diferentes tempos após-infecção (2, 4, 6 e 8h). A proteína VipA (a verde) foi marcada através do anticorpo primário anti-FLAG, e correspondente anticorpo secundário, anti-ratinho ligado ao fluoróforo Alexa Fluor 488 (LPIF03; LPIF159); ou do anticorpo anti-HA, seguido do anticorpo secundário anti-ratazana ligado ao fluoróforo Alexa Fluor 488 (LPJS1). Os filamentos de actina (a vermelho) foram marcadas através da faloidina conjugada ao fluoróforo Alexa Fluor 594. As bactérias e os núcleos (a azul) foram marcados através de DAPI. O primeiro canal de Merge apresenta apenas os canais correspondentes à VipA e F-actina. O segundo canal de Merge corresponde à convergência de todos os canais. As imagens apresentadas são imagens representativas, recolhidas num microscópio Zeiss Axiolmager D2. Barras de escala, 8 μ m.

3.4 Interação de diferentes estirpes de *L. pneumophila* com a via endocítica

Ensaio anteriores demonstraram a interação da proteína efetora VipA com elementos da via endocítica, nomeadamente Rab5 e endossomas precoces^[44] (Franco *et al.*, não publicado). Assim, com o objetivo de verificar se a presença de VipA influencia a co-localização do LCV com os endossomas precoces e lisossomas, foram realizados ensaios de imunofluorescência com diferentes estirpes de *L. pneumophila*.

Macrófagos foram infetados com estirpes de *L. pneumophila*, nomeadamente a estirpe WT, a estirpe cujo gene *dotA* que codifica a proteína correspondente, inerente ao sistema de secreção, foi deletado ($\Delta dotA$), a estirpe em que o gene *vipA* foi deletado ($\Delta vipA$), a estirpe que sobreexpressa 3xFLAG-VipA sob o controlo do promotor tac (P_{tac} -3xFLAG-VipA) e a estirpe que sobreexpressa 4xHA-VipA sob o controlo do promotor natural da bactéria (P_{vipA} -4xHA-VipA). A infeção foi efetuada com uma MOI de 250 e a fixação realizada a tempos após-infeção de 5, 15, 30 e 45 minutos. Num dos ensaios, com um TPI de 30 minutos, foi usada uma MOI de 500. Os endossomas precoces foram marcados com o anticorpo anti-EEA1, e correspondente anticorpo secundário anti-ratinho ligado ao fluoróforo Alexa Fluor 488 (a verde). As bactérias foram marcadas através do anticorpo anti-Lp ligado à rodamina, apresentadas a vermelho na figura (**Figura 3.10**).

Inicialmente, foi realizada uma análise qualitativa, na qual os LCVs correspondentes às estirpes mutantes *dotA* e *vipA* aparentavam demonstrar uma maior co-localização com EEA1, ou seja, o número de vacúolos rodeados de compartimentos EEA1-positivos parecia superior, quando comparado com o observado na infeção com as estirpe WT ou com as estirpes que sobreexpressam VipA (P_{tac} -3xFLAG-VipA; P_{vipA} -4xHA-VipA). Na **figura 3.10**, encontram-se apresentadas imagens representativas de cada estirpe. Tendo isto em conta, foi efetuada uma análise microscópica quantitativa onde foi registado o número de vacúolos EEA1-positivos, correspondentes a cada estirpe, dentro do total de bactérias intracelulares, ou seja, a proporção de LCVs associados a endossomas precoces. Os resultados obtidos das contagens, nos diferentes TPIs e com as diferentes estirpes encontram-se representados na **figura 3.11**, tendo sido efetuada uma análise estatística.

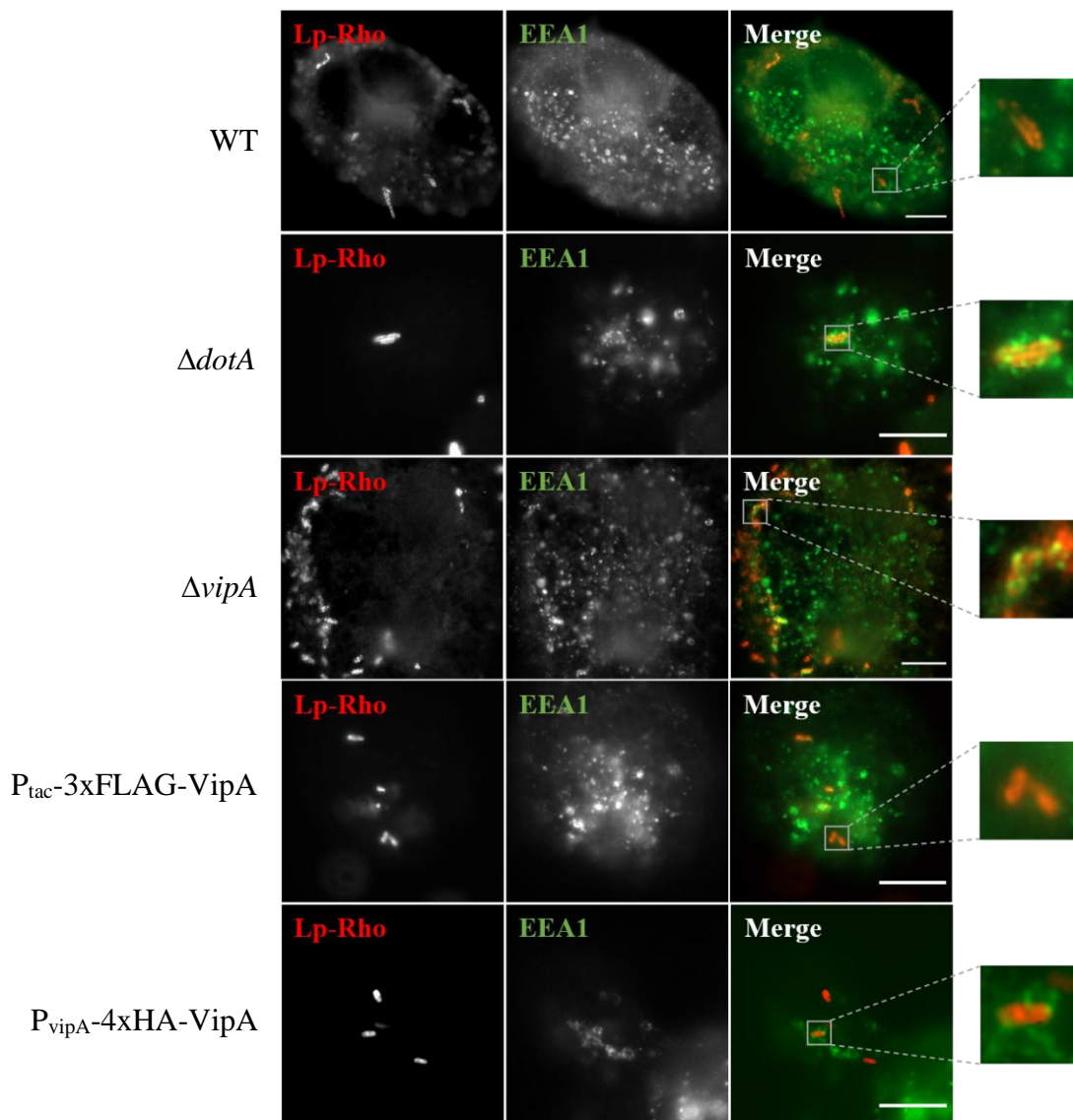


Figura 3.10 – Co-localização do LCV de diferentes estirpes de *L. pneumophila* com endossomas precoces. Macrófagos foram infectados com diferentes estirpes de *L. pneumophila*, a forma WT, o mutante *dotA* ($\Delta dotA$), o mutante *vipA* ($\Delta vipA$), a P_{tac} -3xFLAG-VipA e a P_{vipA} -4xHA-VipA. A infecção foi realizada com uma MOI de 250 e as células infectadas foram fixadas com 4% PFA, a diferentes tempos após-infecção (5, 15, 30 e 45 minutos). As estirpes de *L. pneumophila* (a vermelho) foram marcadas com o anticorpo anti-Lp conjugado com a rodamina (anti-Lp-Rho). Os endossomas precoces (a verde) foram marcados através do anticorpo anti-EEA1, e correspondente anticorpo secundário, anti-ratinho conjugado com o fluoróforo Alexa Fluor 488. As imagens apresentadas são imagens representativas, recolhidas num microscópio Zeiss Axiolmager D2. Barras de escala, 8 μ m.

A estirpe WT e as estirpes que sobreexpressam VipA (P_{tac} -3xFLAG-VipA e P_{vipA} -4xHA-VipA), apresentam perfis semelhantes com baixas percentagens de LCVs EEA1⁺, denotando-se ainda uma diminuição das percentagens de vacúolos EEA1-positivos dos 15 para os 30 minutos (**Figura 3.11**). A análise estatística não revela diferenças significativas entre estas estirpes.

A estirpe mutante *dotA*, por outro lado, apresenta uma percentagem inicial de vacúolos EEA1-positivos superior à observada na WT, sendo que as percentagens são de 35% e 38% aos 5 e 15 minutos,

respetivamente. Esta diferença entre o mutante *dotA* e a estirpe WT era esperada e é explicada pelo facto destas bactérias não terem o sistema Dot/Icm funcional^[50], essencial para a evasão da via endocítica. A percentagem correspondente aos mutantes *dotA*, aos 5 e 15 minutos, é também superior quando comparada com as estirpes que sobreexpressam P_{tac} -3xFLAG-VipA e P_{vipA} -4xHA-VipA. De facto, a análise estatística revelou diferenças significativas entre o mutante *dotA* e as estirpes WT, P_{tac} -3xFLAG-VipA e P_{vipA} -4xHA-VipA ($p < 0,01$), aos 5 minutos e aos 15 minutos (**Figura 3.11 B**). Aos 30 minutos, pode ser observado uma descida acentuada de vacúolos rodeados por compartimentos EEA1-positivos associados a mutantes *dotA*, possivelmente, pela passagem das bactérias dos endossomas precoces para os endossomas tardios e lisossomas, traduzindo-se na continuidade da via endocítica. Adicionalmente, constata-se ainda diferenças significativas entre este mutante e a estirpe WT e P_{tac} -3xFLAG-VipA ($p < 0,01$).

A estirpe mutante *vipA*, por sua vez, apresenta diferenças relativamente às estirpes WT, mutante *dotA* e às estirpes que sobreexpressam P_{tac} -3xFLAG-VipA e P_{vipA} -4xHA-VipA (**Figura 3.11 A**). Aos 5 minutos, os mutantes *vipA* apresentam uma percentagem de 19% de vacúolos EEA1-positivos, que aumenta para 23% aos 15 minutos. Estas percentagens são superiores quando comparadas com as obtidas para as estirpes que sobreexpressam VipA (P_{tac} -3xFLAG-VipA; P_{vipA} -4xHA-VipA), apontando para um efeito de complementação, onde a sobreexpressão de VipA resulta numa menor percentagem de LCVs associados aos endossomas precoces, quando comparado com o mutante *vipA*. Aos 30 minutos, os mutantes *vipA* apresentam um fenótipo semelhante ao dos mutantes *dotA*, traduzido por uma percentagem de vacúolos EEA1-positivos equiparável. Mais, denota-se a presença de diferenças significativas entre os mutantes cujo gene *vipA* foi deletado e as estirpes WT e as que sobreexpressam VipA. Estes resultados sugerem uma possível função de VipA no escape à via endocítica, entre os 15 e 30 minutos após a infeção, uma vez que a presença de VipA parece ser necessária para o LCV evitar a aquisição de EEA1, que é observada no mutante *dotA*.

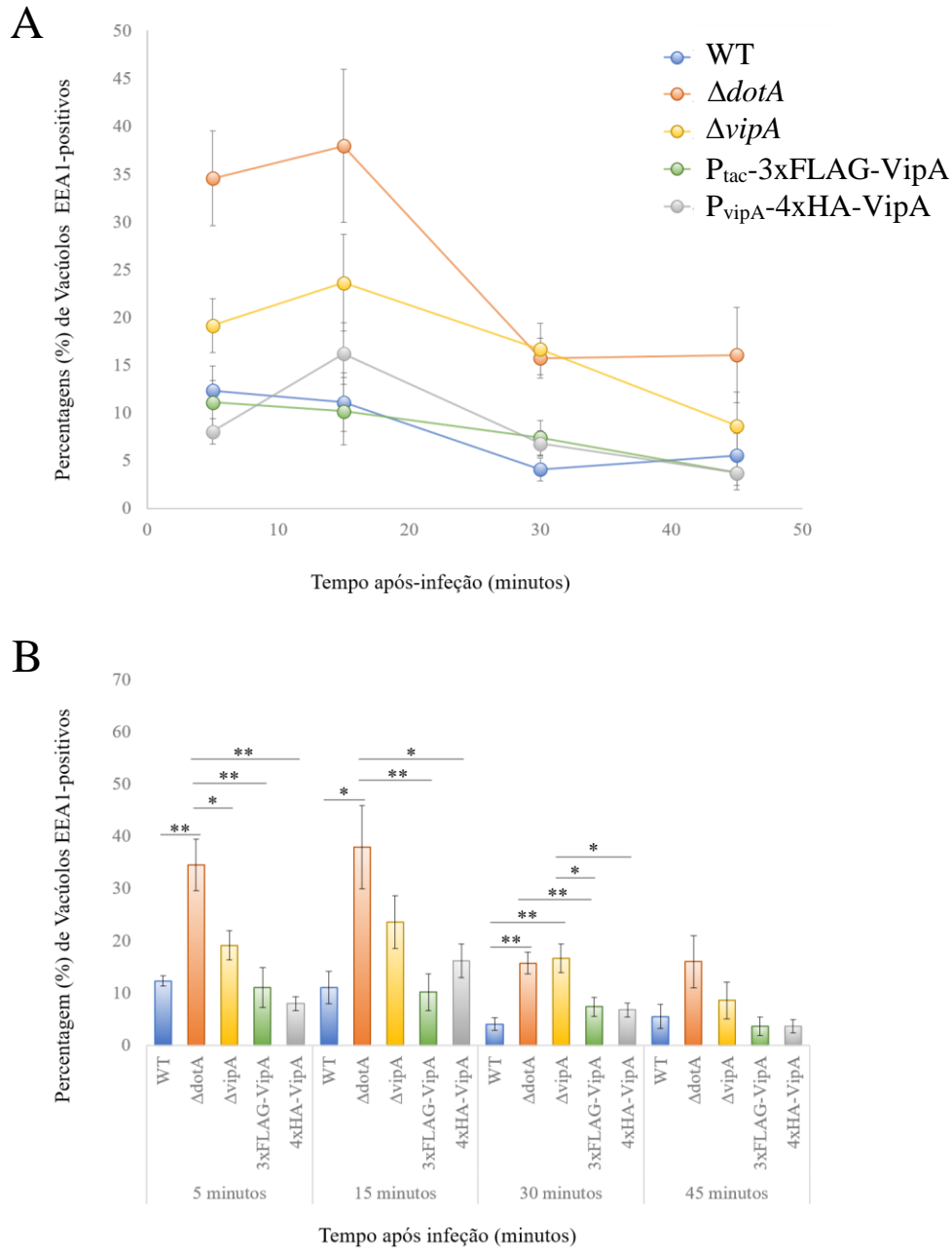


Figura 3.11 - Análise quantitativa da co-localização do LCV de diferentes estirpes de *L. pneumophila* com endossomas precoces, a diferentes tempos após-infecção (TPI). Macrófagos foram infectados com várias estirpes de *L. pneumophila*: WT; estirpes onde o gene $\Delta dotA$ ou o gene $\Delta vipA$ foram deletados; e estirpes que sobreexpressam VipA, P_{lac} -3xFLAG-VipA e P_{vipA} -4xHA-VipA. A infecção foi efetuada com uma MOI de 250 (ou 500 num dos ensaios a 30 minutos) e as células infectadas foram fixadas a diferentes tempos após-infecção (5, 15, 30 e 45 minutos). Para cada condição (estirpe e TPI) foram analisadas, em cada ensaio independente, 54 bactérias, sendo os valores apresentados a média total de vacúolos EEA1-positivos, em percentagem (%). Para o tempo de 5 e 15 minutos foram realizados um total de 3 e 4 ensaios independentes por estirpe, respetivamente. Para os 30 minutos foram realizados 5 ensaios independentes para todas as estirpes, exceto para LPJS1 (n = 3). Para os 45 minutos foram realizados 3 ensaios independentes para todas as estirpes, exceto para LPJS1 (n = 2). Em (A) apresentam-se as percentagens de vacúolos EEA1-positivos nos diferentes TPIs. Em (B) apresenta-se a análise estatística entre estirpes nos diferentes tempos após-infecção, que foi realizada através de *one-way* ANOVA com o teste de Tukey para comparações múltiplas. Diferenças significativas representadas por * (p<0,05), ** (p<0,01). Barras de erro representam o erro padrão da média.

A co-localização do LCV destas mesmas estirpes foi observada relativamente aos lisossomas. Para isso foi efetuado um procedimento semelhante ao mencionado acima, no entanto, as células foram fixadas a TPIs distintos, nomeadamente a 30 min, 90 min e 4h. A marcação das bactérias foi realizada com o anticorpo anti-Lp-rodamina e, a marcação dos lisossomas com anti-LAMP-1 e correspondente anticorpo secundário, anti-ratinho ligado ao fluoróforo Alexa Fluor 488.

Imagens representativas do observado em microscopia encontram-se apresentadas na **figura 3.12**.

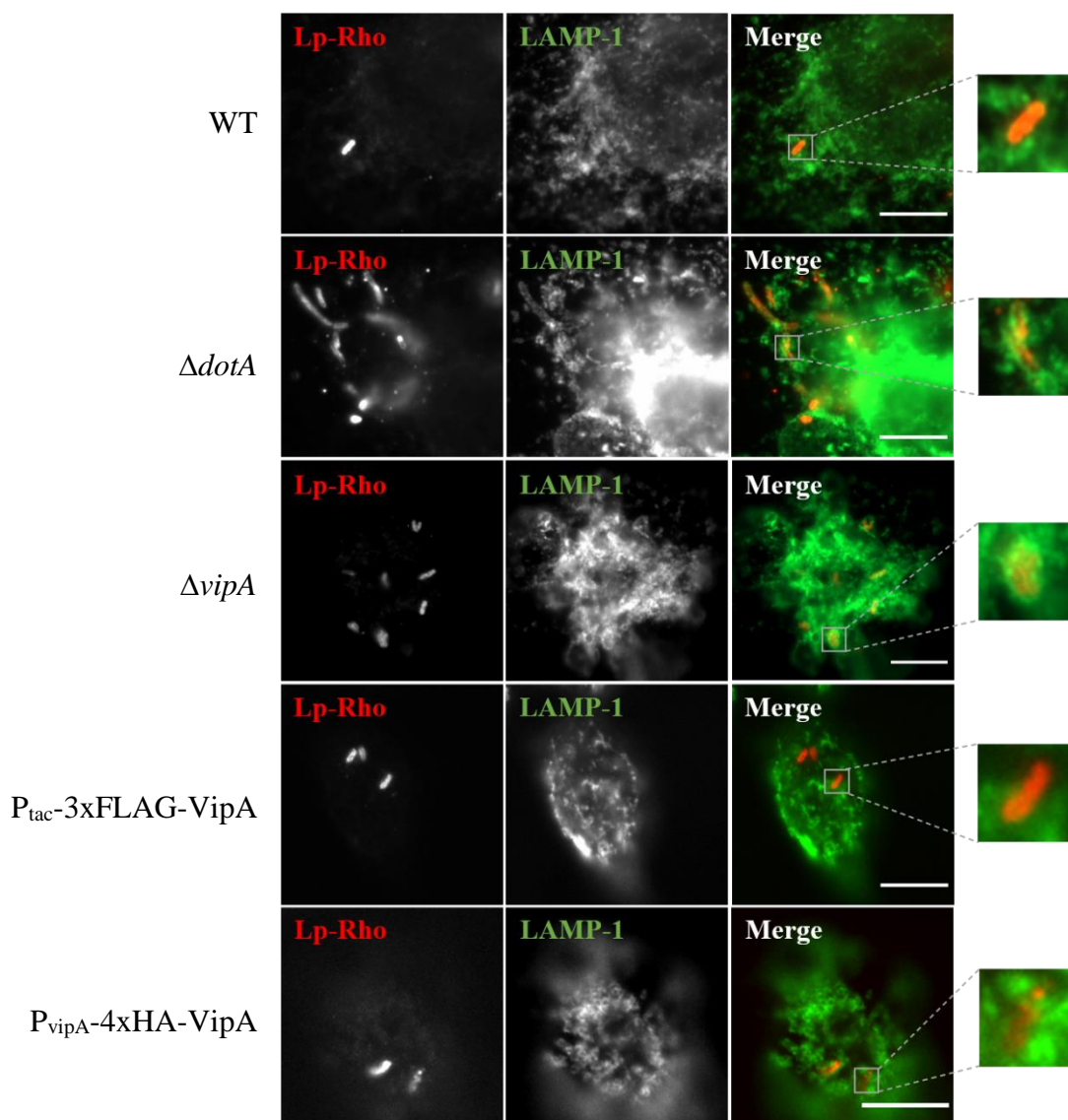


Figura 3.12 - Co-localização do LCV de diferentes estirpes de *L. pneumophila* com lisossomas. Macrófagos foram infectados com diferentes estirpes de *L. pneumophila*, a forma WT, o mutante *dotA* ($\Delta dotA$), o mutante *vipA* ($\Delta vipA$), a P_{tac} -3xFLAG-VipA e a P_{vipA} -4xHA-VipA. A infeção foi realizada com uma MOI de 250 e as células infectadas foram fixadas com 4% PFA, a diferentes tempos após-infeção (30 min, 90 min, 4 horas). As estirpes de *L. pneumophila* (a vermelho) foram marcadas com o anticorpo anti-Lp conjugado com a rodamina (anti-Lp-Rho). Os lisossomas (a verde) foram marcados através do anticorpo anti-LAMP-1, e correspondente anticorpo secundário, anti-ratinho conjugado com o fluoróforo Alexa Fluor 488. As imagens apresentadas são imagens representativas, recolhidas num microscópio Zeiss AxioImager D2. Barras de escala, 8 μ m.

A análise qualitativa revelou uma co-localização com o marcador lisossomal LAMP-1, nomeadamente nos LCVs das estirpes mutantes *dotA* e *vipA*, nos diferentes TPIs (**Figura 3.12**). Por outro lado, nas estirpes WT, P_{tac}-3xFLAG-VipA e P_{vipA}-4xHA-VipA a presença de vacúolos LAMP-1-positivos não se mostrou tão prevalente.

Deste modo, foi efetuada uma análise quantitativa, realizando-se a contagem de 54 bactérias totais, de cada estirpe, por cada ensaio (**Figura 3.13**).

As bactérias sem sistema de secreção funcional (estirpe *dotA*) demonstram uma percentagem inicial de 49% de vacúolos LAMP-1-positivos (30 minutos), sofrendo uma diminuição para 44% aos 90 minutos, e um pequeno acréscimo para 52% às 4 horas (**Figura 3.13**). A comparação destes valores com os obtidos para a estirpe WT, revela percentagens superiores de vacúolos LAMP-1-positivos para a estirpe mutante, verificando-se uma diferença significativa aos 30 minutos ($p < 0,05$). De igual forma, verifica-se diferenças nas percentagens entre este mutante e as estirpes que sobreexpressam VipA, P_{tac}-3xFLAG-VipA e P_{vipA}-4xHA-VipA, observando-se aos 30 minutos e 4h uma diferença significativa com P_{tac}-3xFLAG-VipA ($p < 0,01$ e $p < 0,05$, respetivamente). Este efeito da associação com lisossomas nas estirpes mutantes *dotA*, comparativamente às outras estirpes, realçam mais uma vez a menor capacidade de patogenicidade associada a estas bactérias.

Os mutantes *vipA* apresentam percentagens de vacúolos LAMP-1-positivos de 31, 33 e 27% para os 30 minutos, 90 minutos e 4h, respetivamente. No caso das estirpes que sobreexpressam a proteína VipA, existe uma menor percentagem dos LCVs associados aos lisossomas relativamente aos mutantes *vipA* (P_{tac}-3xFLAG-VipA (11%); P_{vipA}-4xHA-VipA (23%)). Nos restantes TPIs (90 min; 4h), esta diferença de percentagens permanece, embora que não tão proeminente. É de salientar que aos 30 minutos, o mutante *vipA* revela um fenótipo intermédio relativamente ao observado para o selvagem e para o mutante *dotA*, ou seja, a fusão com os lisossomas ocorre em maior número que na estirpe selvagem, embora não tão acentuadamente como no mutante sem sistema Dot/Icm. Embora estas divergências nas percentagens de vacúolos LAMP-1-positivos sejam visíveis, a análise estatística não relevou diferenças significativas. Isto pode dever-se ao facto de terem sido realizadas apenas 3 experiências e, portanto, o conjunto de dados não apresentar “robustez” suficiente no teste estatístico utilizado.

A análise estatística com a estirpe que expressa P_{vipA}-4xHA-VipA não foi efetuada, uma vez que não foram realizados ensaios em número suficiente, devido à contingência de tempo.

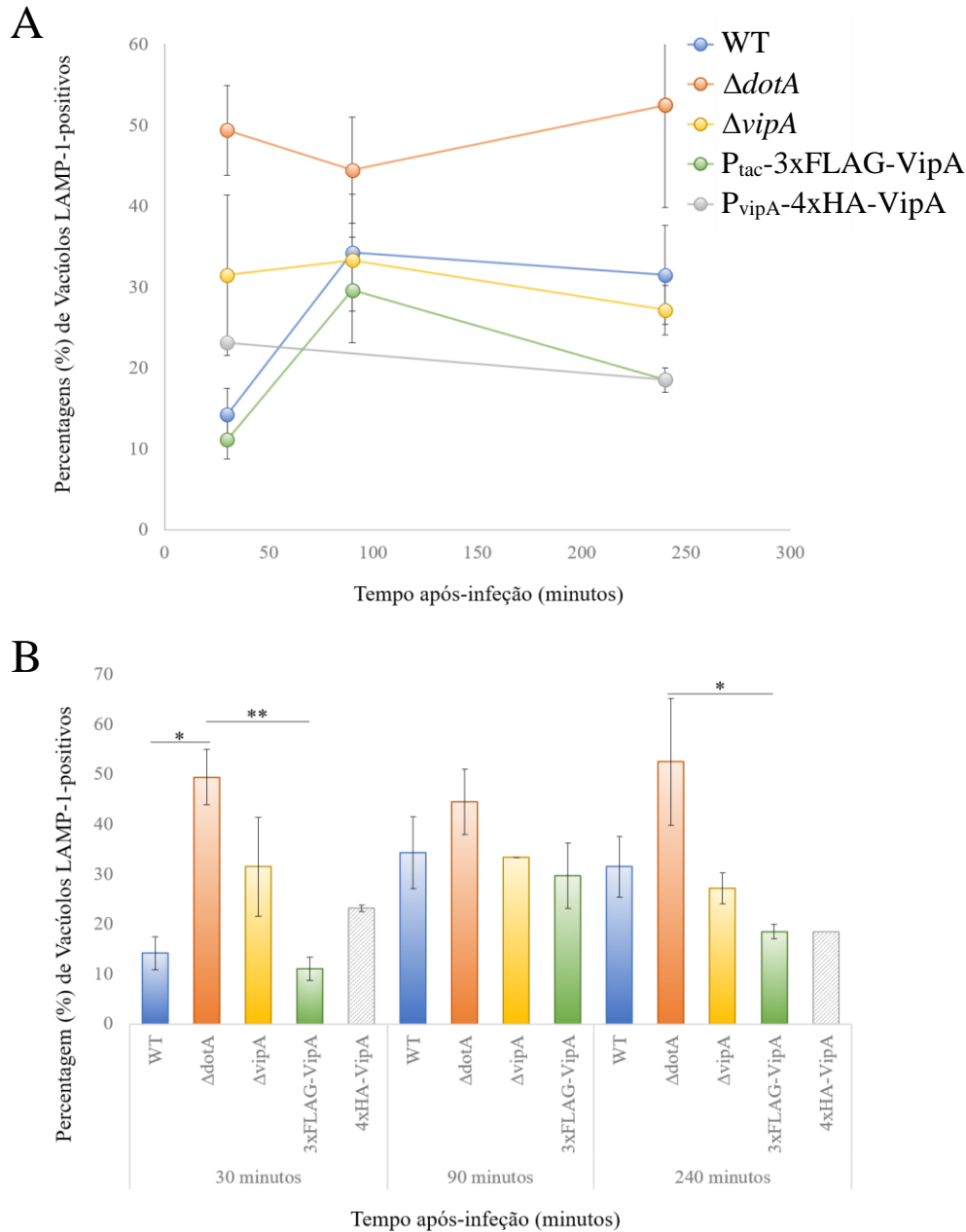


Figura 3.13 - Análise quantitativa da co-localização do LCV de diferentes estirpes de *L. pneumophila* com lisossomas, a diferentes tempos após-infecção (TPI). Macrófagos foram infectados com várias estirpes de *L. pneumophila*: WT; estirpes onde o gene $\Delta dotA$ ou o gene $\Delta vipA$ foram deletados; estirpes que sobreexpressam VipA, P_{tac} -3xFLAG-VipA e P_{vipA} -4xHA-VipA. A infecção foi efetuada com uma MOI de 250 (e 500 num dos ensaios realizados aos 30 minutos) e as células infectadas foram fixadas com 4% PFA, a diferentes tempos após-infecção (30 min, 90 min, 4 h). Para cada condição (estirpe e TPI) foram analisadas, em cada ensaio independente, 54 bactérias, sendo os valores apresentados a média total de vacúolos LAMP-1-positivos, em percentagem (%). Para o tempo de 30 minutos, foram realizados um total de 3 ensaios independentes por estirpe. Para os 90 minutos, foram realizados 2 ensaios independentes para todas as estirpes, exceto para LPJS1. Para as 4h, foram realizados 3 ensaios independentes para todas as estirpes, exceto para LPJS1 (n = 1). Em (A) apresentam-se as percentagens de vacúolos LAMP-1-positivos nos diferentes TPIs. Em (B) apresenta-se a análise estatística entre estirpes nos diferentes tempos após-infecção, que foi realizada através de *one-way* ANOVA com o teste de Tukey para comparações múltiplas. Diferenças significativas representadas por * (p<0,05), ** (p<0,01). Barras de erro representam o erro padrão da média.

Em suma, pode-se inferir pelos resultados um papel de VipA na evasão da via endocítica, possivelmente entre os 15 e 30 minutos após a infecção, traduzida pela complementação dos fenótipos observados nos mutantes *vipA* aquando da sobreexpressão de VipA. Esta função de VipA é ainda salientada pela existência de diferenças significativas dos mutantes *vipA* quando comparada à estirpe WT. Igualmente, a ausência de diferenças significativas entre os 5 e 15 minutos na fusão com endossomas precoces pode ser hipoteticamente explicado por uma expressão temporal de outros efetores, cuja expressão, a estes TPIs, é mais proeminente comparativamente a VipA. É necessário ainda ponderar que a ausência de diferenças significativas poderá dever-se ao baixo número de ensaios ($3 < n < 4$).

3.5. Unidades formadoras de colónias (UFCs)

De forma a testar se o fenótipo observado nas co-localizações com os endossomas precoces e lisossomas era traduzido em diferenças na viabilidade das diferentes estirpes de *L. pneumophila* (WT; mutante $\Delta dotA$; mutante $\Delta vipA$), foram analisadas as UFCs resultantes de infeções com as mesmas. Para isto, macrófagos foram infetados com uma MOI de 50 das diferentes estirpes e subsequentemente incubadas na presença de gentamicina, de forma a eliminar todas as bactérias em suspensão ou que aderiram às células. Portanto, após esta incubação, correspondente ao tempo 0 horas (após infecção), só sobrevivem as bactérias que foram internalizadas. A infecção foi deixada então a prosseguir por 24 e 48h. Após esses períodos, as células foram lisadas e diluições seriadas realizadas, tendo sido plaqueadas em CYE as diluições apropriadas. O número de colónias foi enumerado. Também foram plaqueadas diluições seriadas feitas a partir do *stock* inicial de cultura usado na infecção, de modo a verificar o número exato de bactérias das diferentes estirpes utilizado aquando da infecção

As UFCs por poço, ao tempo 0h, correspondem às bactérias internalizadas pelo hospedeiro, em cada estirpe. Através da **tabela 3.2**, verifica-se que o número de bactérias internalizadas encontra-se na ordem dos 10^4 na estirpe WT e mutante *vipA*, apresentando o mutante *vipA* um número 1,3 vezes menor que o apresentado em WT (diluição 10^{-3}). Este efeito pode possivelmente traduzir uma maior dificuldade na entrada dos mutantes *vipA*, e por isso um papel de VipA no processo de internalização em macrófagos. Por outro lado, a quantidade de bactérias do mutante *dotA* aparenta ser, mais ou menos, 10 vezes maior (ordem dos 10^5), comparativamente às outras estirpes. Esta diferença poderia apontar para uma maior capacidade de invasão por parte dos mutantes *dotA*, no entanto, tendo em conta as UFCs correspondentes ao *stock* de cada estirpe, este efeito pode ser explicado pelo facto de haver uma maior quantidade de UFCs/mL no *stock* da estirpe mutante *dotA*. Claro está que, visto que o ensaio foi realizado apenas uma vez devido a questões de tempo, esta conjectura é especulativa.

Tabela 3.2 - Unidades formadoras de colónias obtidas nos diferentes TPIs (0, 24 e 48 horas) e no *stock* correspondente a cada estirpe.

Tempo após- infecção (horas)	Estirpe de <i>L. pneumophila</i> (UFC/poço)			
	Diluição	WT	$\Delta dotA$	$\Delta vipA$
Stock	10^{-4}	$2,5 \times 10^7$	$1,2 \times 10^8$	$5,2 \times 10^7$
	10^{-5}	$2,3 \times 10^7$	$1,2 \times 10^8$	$4,6 \times 10^7$
0	10^{-2}	4×10^3	$2,2 \times 10^5$	$2,5 \times 10^4$
	10^{-3}	4×10^4	$2,9 \times 10^5$	3×10^4
24	10^{-2}	$2,2 \times 10^5$	$6,6 \times 10^4$	$4,4 \times 10^5$
	10^{-3}	$1,5 \times 10^5$	7×10^4	$1,8 \times 10^5$
48	10^{-2}	$2,3 \times 10^5$	4×10^4	$2,9 \times 10^5$
	10^{-3}	$1,9 \times 10^5$	9×10^4	$2,6 \times 10^5$

De forma a analisar a replicação das bactérias, correspondentes às diferentes estirpes, que entraram nas células e, ao mesmo tempo descartar o facto de algumas estirpes apresentarem um maior número de bactérias internalizadas, foi construído um gráfico onde as UFCs/poço foram divididas pelas UFCs obtidas no tempo 0 h (**Figura 3.14**). Às 24 h, verifica-se a multiplicação das bactérias correspondentes às estirpes WT e mutante *vipA*. No caso dos mutantes *dotA*, verifica-se um decréscimo das UFCs comparativamente às outras estirpes, podendo este efeito corresponder à morte de mutantes *dotA*. Às 48 horas, constata-se um aumento das unidades formadoras de colónias na estirpe WT, sendo o mesmo observado no mutante *vipA*. Comparativamente, o mutante *dotA* apresenta uma diminuição nas UFCs.

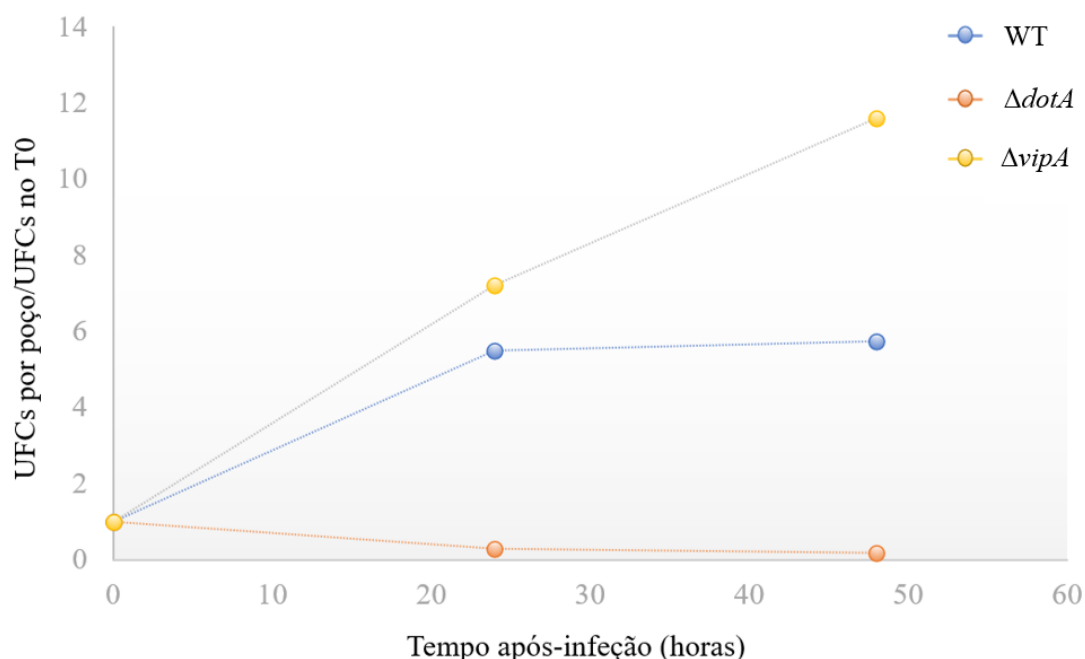


Figura 3.14 – Multiplicação das diferentes estirpes de *L. pneumophila* ao longo do tempo. Macrófagos foram infectados (MOI de 50) com as estirpes WT e mutante *dotA* e *vipA* e incubados com gentamicina. Após 0, 24 e 48 horas as células foram lisadas e um conjunto de diluições seriadas realizadas, sendo plaqueadas as diluições apropriadas. O número de colônias foi enumerado.

Tendo em conta estes resultados, este ensaio confirma uma menor viabilidade dos mutantes *dotA* quando comparado com WT, consequência de uma maior dificuldade na multiplicação intracelular. Esta discrepância entre estas duas estirpes já tinha sido demonstrada em trabalhos anteriores, em macrófagos derivados da medula óssea de ratinhos^[53]. A estirpe mutante *vipA*, por sua vez, apresenta um perfil semelhante à estirpe WT, embora a sua capacidade de internalização aparenta ser ligeiramente inferior, sugerindo um papel de VipA na internalização de *L. pneumophila*. De facto, um papel desta proteína no processo de internalização já tinha sido sugerido por Prashar *et al.* em células epiteliais dos pulmões, num estudo realizado em 2018^[54]. Apesar destes resultados, seriam necessários a realização de mais ensaios e de uma análise estatística, determinando se as diferenças observadas entre as diferentes estirpes são significativas. O erro associado ao próprio ensaio pode explicar as discrepâncias observadas entre diluições, nomeadamente no mutante *vipA* (0h-24h) e no mutante *dotA* (24h-48h).

4. Discussão

Legionella pneumophila exerce a sua patogenicidade através da translocação de mais de 300 proteínas efetoras^{[8][16][31]}, dentro das quais a VipA demonstra a capacidade de modular o citoesqueleto de actina^{[43][44][45]}. Este componente celular é alvo de diferentes agentes patogénicos, que podem afetar indiretamente a polimerização de actina: ao imitarem os fatores que promovem a nucleação (*Nucleation promoting factors* - NPFs), por exemplo IcsA e ActA de respetivamente *Shigella* e *Listeria monocytogenes*, que induzem a polimerização através da ativação do nucleador de actina eucariótico (o complexo Arp2/3)^{[37][45]}; ou afetando a polimerização de actina a um nível mais a montante, funcionando como GEFs ou GAPs de Rho GTPases (responsáveis pela ativação de NPFs). A quantidade de efetores conhecidos que, no entanto, influenciam diretamente a polimerização de actina é reduzida. Exemplos incluem o efector Tarp de *Chlamydia*, BimA de *Burkholderia*, SipC de *Rickettsia* e VipA em *L. pneumophila*^{[37][45]}. A proteína VipA foi identificada aquando um *screening* de proteínas efetoras capazes de interferir no tráfego membranar em *Saccharomyces cerevisiae*^[43], sendo estabelecida mais tarde como um nucleador de actina^{[44][45]}. Mais, foi sugerido uma ligação entre a sua função como nucleador de actina e a sua capacidade de interferir no tráfego membranar, uma vez que foi observado que um mutante *vipA-1* (que não interferia no tráfego de corpos multivesiculares (MVB) em levedura) apresentava uma capacidade reduzida de polimerizar actina^[45]. A Rab5 é uma proteína GTPásica eucariótica endógena, um regulador essencial da biogénese dos endossomas e tráfego membranar, tendo um papel essencial no processo de maturação de endossomas precoces para endossomas tardios (via endocítica). Adicionalmente, um papel de Rab5 na disrupção de LCV foi estabelecido, onde a integridade do LCV de mutantes *sdhA* aumentou aquando da deleção desta GTPase da célula^[55]. Uma interação entre VipA e Rab5 foi demonstrada através de ensaios de co-localização e co-imunoprecipitação em células epiteliais (Franco *et al.*, não publicado). Os ensaios de co-imunoprecipitação recorreram à precipitação de GFP-Rab5 na presença de VipA^{WT}-myc ou VipA^{ANH2}-myc. Os resultados obtidos indicaram uma interação VipA-Rab5 (**Figura 1.8**), tendo sido atribuída à região N-terminal de VipA a mediação desta associação (Franco *et al.*, não publicado).

Tendo em conta a interação VipA-Rab5 verificada em ensaios anteriores, neste estudo procurámos determinar se a presença de Rab5 influencia a reação de polimerização de actina mediada por VipA, através de ensaios *in vitro* de actina-pireno. Como esperado^{[44][45]}, a presença de apenas His₆-VipA^{WT} resultou num aumento da taxa de polimerização, e na diminuição da fase *lag* da reação de polimerização (**Figura 3.2 A; Figura 3.3**). Contrariamente, a presença de GST-Rab5 na sua forma ativa (GST-Rab5^{CA}) induziu a inibição parcial da polimerização de actina mediada por His₆-VipA^{WT}. De facto, os ensaios efetuados com o His₆-VipA^{ANH2} e GST-Rab5^{CA} ou com GST-Rab5^{DN} e His₆-VipA^{WT} corroboram este efeito, apresentando as curvas correspondentes a cada uma destas incubações perfis semelhantes ao obtido aquando da incubação com apenas His₆-VipA, em cada ensaio, e tendo em conta o erro associado. Estes resultados sugerem então que a inibição parcial da polimerização de actina mediada por VipA

advém da interação de Rab5 na sua forma ativa com VipA. Na presença de GST-Rab5^{WT}, que se encontra maioritariamente na forma inativa, é observada de igual forma uma inibição parcial da polimerização de actina. No entanto, verifica-se uma inibição mais tardia na reação de polimerização de actina, comparado com o observado com a GST-Rab5^{CA}. Uma hipótese para explicar esta diferença, baseia-se na presença de moléculas Rab5 na conformação “on”, que podem afetar o comprimento dos filamentos de actina, podendo explicar a diminuição da intensidade de fluorescência máxima verificada neste trabalho (**Figura 3.3 B**). De facto, estudos prévios demonstraram que a presença de Rab5 ativa (Rab5^{CA}) na presença de VipA resultava numa diminuição do comprimento total de filamentos^[49].

Para verificar a presença de interação VipA-Rab5 em contexto de infeção, ensaios de co-imunoprecipitação teriam de ser realizados, onde a proteína 4xHA-VipA seria precipitada e a presença de Rab5 na fração ligada seria confirmada por *immunoblot*. Contudo, o método bioquímico utilizado aquando da lise celular teve de ser confirmado como o ideal para a deteção de VipA translocada para o citosol dos macrófagos. Para isto, ensaios de translocação, ao TPI de 2h, foram realizados. Este TPI foi o selecionado visto que, a este tempo, a co-localização entre 3xFLAG-VipA e Rab5 endógena era mais evidente. Nos ensaios de translocação, verificámos a presença da proteína controlo GFP no sobrenadante, apontando para uma possível lise bacteriana. De modo a descartar esta última, o mesmo número de bactérias utilizadas aquando da infeção nos ensaios de translocação foi incubado com tampões de lise com diferentes tipos e concentrações de detergentes. Os resultados associados a estes ensaios foram inconclusivos, e por uma questão de tempo, não foi possível a repetição dos mesmos, impossibilitando assim a otimização das condições experimentais para realização dos ensaios de Co-IP. É ainda necessário destacar que foi verificado, nos ensaios de co-localização, um *background* elevado associado ao anticorpo anti-Rab5, não sendo por isso completamente fiável a localização desta GTPase. Este efeito pode dever-se a diferentes possibilidades, incluindo um bloqueio ineficiente de potenciais locais de ligação não específica, reatividade cruzada do anticorpo secundário dando origem a ligações não específicas, entre outros.

A localização de VipA na célula quando sob o controlo de diferentes promotores foi analisada, bem como a sua associação a F-actina. A estirpe LPJS1 que sobreexpressa 4xHA-VipA sob o controlo do promotor natural da bactéria (P_{vipA}-4xHA-VipA) foi construída. A localização de P_{vipA}-4xHA-VipA, *versus* de VipA quando expressa sob o controlo do promotor indutível tac (P_{tac}-3xFLAG-VipA), foi sujeita a comparação, e a localização de ambas, relativamente à actina observada. Esta comparação, no entanto, não foi possível de efetuar uma vez que P_{vipA}-4xHA-VipA não foi detetada. P_{tac}-3xFLAG-VipA, por sua vez, demonstra uma localização maioritariamente citosólica, observando-se uma co-localização entre esta última e a actina em alguns pontos, a diferentes tempos após-infeção. A ausência de sinal de P_{vipA}-4xHA-VipA relativamente a P_{tac}-3xFLAG-VipA, deve-se potencialmente à diferença de promotores, uma vez que o promotor tac é um promotor indutível, sintetizado de forma a maximizar a expressão, contrariamente ao promotor natural P_{vipA}, que regula a expressão conforme os estímulos do

ambiente em que a bactéria se encontra. A repetição destes ensaios recorrendo a uma maior gama de TPIs, bem como a uma maior MOI seria essencial para possivelmente localizar P_{vipA}-4xHA-VipA.

A interação de diferentes estirpes de *L. pneumophila* com a via endocítica foi analisada, bem como a importância de VipA nesta mesma via. Estudos verificaram, em contexto de infeção, a associação de VipA translocada com endossomas precoces, em macrófagos, tendo sido estes resultados corroborados em ensaios adicionais aquando da expressão ectópica desta proteína efetora em células de mamífero^{[37][44][45]}. Neste trabalho, a associação dos LCVs dos mutantes *dotA* e *vipA*, da estirpe WT, das estirpes que sobreexpressam P_{tac}-3xFLAG-VipA e P_{vipA}-4xHA-VipA, com os endossomas precoces e lisossomas foi quantificada por microscopia. Estes resultados demonstraram uma associação do mutante *dotA* com os endossomas precoces e lisossomas, a diferentes TPIs, sendo observadas diferenças significativas entre este mutante e a estirpe WT. De facto, a percentagem de vacúolos EEA1 e/ou LAMP-1-positivos foi superior neste mutante, apontando para uma menor capacidade de evasão à fusão com os endossomas precoces e lisossomas, e potencialmente à fuga da via endocítica. Estas diferenças eram esperadas uma vez que estes mutantes carecem de uma proteína essencial ao sistema de secreção do tipo IVB^[50], sendo frequentemente usadas como controlo negativo de secreção de efetores. Nos mutantes *vipA* observou-se percentagens de vacúolos EEA1-positivos superiores quando comparado à estirpe WT. Adicionalmente, são também verificadas diferenças entre o mutante *vipA* e as estirpes que sobreexpressam esta proteína, onde as percentagens de vacúolos EEA1-positivos associadas a P_{tac}-3xFLAG-VipA e P_{vipA}-4xHA-VipA são inferiores, apontando para um efeito de complementação aquando da sobreexpressão de VipA. De facto, aos 30 minutos foram constatadas diferenças significativas entre o mutante *vipA* e as estirpes anteriores. Ou seja, isto pode sugerir um papel de VipA na evasão da via endocítica. A ausência de diferenças significativas a tempos após-infeção antecedentes pode dever-se ao baixo número de ensaios efetuados ou à expressão proeminente de outros fatores de virulência a esses TPIs que não a VipA, que afetam a via endocítica. Exemplos podem incluir as proteínas efetoras (VipD e VipF) descritas juntamente com VipA, que demonstraram interferir na via de tráfego membranar em levedura^[43]. VipD é uma fosfolipase que localiza em endossomas precoces, formando um complexo com Rab5 e Rab22, interferindo no recrutamento dos efetores de Rab5, e travando assim o processo de maturação^[46]. LegK2, outro efector de *Legionella*, foi sugerido afetar a fusão com elementos da via endocítica ao inibir a polimerização de actina local, mediada pelo complexo Arp2/3, no LCV^[56]. Esta regulação temporal da expressão de efetores não é inaudita, tendo já sido verificada em *Legionella*, aquando da expressão dos efetores SidH e LubX. A expressão de SidH, um efector detetado no hospedeiro imediatamente após a infeção, é controlado por LubX, presente horas após a infeção. LubX é um metaefetor responsável pela degradação, através de poliubiquitinação, de SidH. Um estudo efetuado em moscas parece indicar a importância deste controlo de SidH por LubX, uma vez que bactérias mutantes *lubX* provocam uma maior taxa de mortalidade nas moscas neste hospedeiro. Assim, esta regulação da quantidade de SidH por parte de LubX numa fase mais tardia da infeção, parece

ser benéfica para *Legionella*^[57]. Outros microrganismos demonstraram esta regulação temporal da expressão, como a *Salmonella spp.* No caso de *Salmonella typhimurium* a expressão temporal dos efetores SopE e SptP translocados em quantidades semelhantes para o hospedeiro, é regulada através de uma diferença na estabilidade proteica, onde SopE é eliminado mais rapidamente comparado a SptP, cuja cinética de degradação é inferior. SopE é fundamental no processo de internalização de *Salmonella*, sendo responsável pela formação de “*ruffles*” membranares aquando da ativação da Rho GTPase Cdc42, enquanto que SptP promove a recuperação da arquitetura celular normal da célula hospedeira^[57]. Este controlo na expressão permite a continuidade do processo de infeção por parte desta bactéria.

Foram realizados ensaios de unidades formadoras de colónias (UFCs), de forma a determinar se o fenótipo observado nos ensaios anteriores (associação dos LCVs com endossomas precoces e lisossomas), era traduzido em diferenças de viabilidade nas estirpes de *L. pneumophila*: WT, mutantes *dotA* e *vipA*. A menor viabilidade associada aos mutantes *dotA* foi corroborada, sendo verificada uma diminuição do número de bactérias das 0-24h. Contrariamente, as estirpes WT e mutante *vipA* apresentaram um aumento no número de unidades formadoras de colónias (UFCs/poço), nos diferentes TPIs. Ao tempo 0h, a comparação da estirpe WT com o mutante *vipA* resultou num maior número de UFCs para a primeira. Prashar *et al.* (2018) sugeriu uma função de VipA no processo de internalização em células epiteliais do pulmão, onde este efector poderia complementar a atividade de nucleação dependente do complexo Arp2/3 e mDia, promovendo um *uptake* mais rápido de *L. pneumophila* filamentososa^[54]. Assim, e sabendo que o tempo 0h corresponde ao número de bactérias internalizadas, este resultado poderia apontar para um possível papel de VipA no processo de internalização, em macrófagos. Contudo, mais ensaios teriam de ser realizados e uma análise estatística efetuada para confirmação de diferenças significativas.

A interação *in vitro* com Rab5 e a maior percentagem de vacúolos EEA1-positivos nos mutantes *vipA*, relativamente à estirpe WT e às que sobreexpressam VipA, P_{tac}-3xFLAG-VipA e P_{VipA}-4xHA-VipA, verificada neste trabalho, e os resultados em estudos precedentes^{[43][44][45]} (Franco *et al.*, não publicado) apontam para uma possível intervenção por parte de VipA na via endocítica. No entanto, o mecanismo associado à função de VipA na via endocítica é desconhecido. Noutros bactérias, associações entre a actina e mecanismos de proteção que contribuem para a sobrevivência destes agentes patogénicos no hospedeiro, foram descritas por exemplo: em *Shigella flexneri*, que polimeriza actina em torno do BCV (*Bacterium-containing vacuole*) formando um “*casulo*” de actina, protegendo a bactéria do citosol do hospedeiro^[58]; ou em *Chlamydia trachomatis* que origina e mantém uma “*cage*” rica em actina em torno da inclusão, contribuindo para a estabilização deste compartimento^[59]. Contudo, VipA foi demonstrada não localizar no LCV aquando da infeção de macrófagos^[45], pelo que um mecanismo que pode explicar a função de VipA na via de degradação, pode traduzir-se na remodelação da rede de F-actina associada aos endossomas precoces por parte de VipA, que interage com Rab5 através do seu N-terminal,

resultando na evasão da fusão com os EE. Em que medida essa interferência ocorre é difícil de apontar, uma vez que o papel da rede de actina nos endossomas precoces não está completamente elucidado. Contudo, foi indicada uma associação de actina a processos de fissão, a movimentos de curto alcance através de regiões ricas em actina e possível envolvimento no movimento de endossomas, no transporte de carga e na morfologia dos endossomas^[60]. Outro possível mecanismo centra-se na modulação da via endocítica através da ação de VipA sob Rab5, funcionando este efector como uma GAP, induzindo a inativação de Rab5 e consequentemente impedindo o processo de fusão do LCV com os endossomas precoces, modulando assim o ciclo de ativação desta GTPase. De facto, muitos microrganismos recorrem a estratégias que afetam as proteínas Rab GTPases. Exemplos incluem, SifA e SopB de *S. enterica*: SifA interage com SKIP, formando um complexo capaz de recrutar Rab9 para o SCV (*Salmonella containing vacuole*), interferindo no transporte de enzimas hidrolíticas para o lisossoma, e prevenindo assim a aquisição destas enzimas para o SCV; SopB contribui para um atraso no processo de maturação, onde a sua atividade de fosfatidilinositol fosfatase reduz a carga superficial da membrana ao consumir o fosfatidilinositol-4-5-bifosfato (PIP2), interferindo no recrutamento de Rabs envolvidas na maturação endocítica. *Chlamydia*, apresenta na inclusão a proteína CT229 que está envolvida no recrutamento da Rab4a, sendo sugerido uma associação desta interação com a biogénese da inclusão onde a bactéria se localiza^[46].

Em suma, este estudo demonstrou que a interação de Rab5 na sua forma ativa com VipA resulta numa inibição parcial da polimerização de actina mediada por VipA, *in vitro*. Adicionalmente, nos ensaios onde foram quantificadas a associação das diferentes estirpes de *L. pneumophila* com elementos da via endocítica, mutantes *vipA* apresentaram uma maior percentagem de vacúolos EEA1-positivos comparado com WT, parecendo este efeito ser compensado pela sobreexpressão de VipA. Estes resultados sugerem um papel de VipA na evasão da via endocítica, potencialmente pela sua interação com Rab5. A interação VipA-Rab5 em contexto de infeção não foi possível analisar, uma vez que os ensaios de translocação efetuados foram inconclusivos, sendo necessário a otimização das condições (tampões de lise; proteína controlo de translocação) associadas a estes ensaios.

5. Bibliografia

- [1] D. J. BRENNER, «Classification of the Legionnaires' Disease Bacterium: *Legionella pneumophila*, genus novum, species nova, of the Family Legionellaceae, familia nova», *Ann. Intern. Med.*, vol. 90, n. 4, p. 656, Abr. 1979.
- [2] J. E. McDade, C. C. Shepard, D. W. Fraser, T. R. Tsai, M. A. Redus, e W. R. Dowdle, «Legionnaires' Disease», *N. Engl. J. Med.*, vol. 297, n. 22, pp. 1197–1203, Dez. 1977.
- [3] D. L. Kasper, S. L. Hauser, J. L. Jameson, A. S. Fauci, D. L. Longo, e J. Loscalzo, «Legionella Infections», em *Harrison's principles of Internal Medicine*, 19th ed., New York: McDraw-Hill Education, 2015, pp. 1014–1020.
- [4] J. W. Gooch, «Pontiac Fever», *Encycl. Dict. Polym.*, vol. 107, n. 2, pp. 916–916, 2011.
- [5] Q. Zhang *et al.*, «Legionnaires' Disease Caused by *Legionella pneumophila* Serogroups 5 and 10, China», *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 20, n. 7, Jul. 2014.
- [6] World Health Organization, «Legionellosis», 2018. [Em linha]. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/legionellosis>.
- [7] A. Farnham, L. Alleyne, D. Cimini, e S. Balter, «Legionnaires' disease incidence and risk factors, New York, New York, USA, 2002–2011», *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 20, n. 11, pp. 1795–1802, 2014.
- [8] S. Mondino, S. Schmidt, M. Rolando, P. Escoll, L. Gomez-Valero, e C. Buchrieser, «Legionnaires' Disease: State of the Art Knowledge of Pathogenesis Mechanisms of *Legionella*», *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, vol. 15, n. 1, pp. 439–466, Jan. 2020.
- [9] A. Hubber e C. R. Roy, «Modulation of Host Cell Function by *Legionella pneumophila* Type IV Effectors », *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 26, n. 1, pp. 261–283, 2010.
- [10] B. M. W. Diederer, «*Legionella* spp. and Legionnaires' disease», *J. Infect.*, vol. 56, n. 1, pp. 1–12, 2008.
- [11] A. Best e Y. A. Kwaik, «Evolution of the arsenal of *Legionella pneumophila* effectors to modulate protist hosts», *MBio*, vol. 9, n. 5, pp. 1–16, 2018.
- [12] N. Phin *et al.*, «Epidemiology and clinical management of Legionnaires' disease», *Lancet Infect. Dis.*, vol. 14, n. 10, pp. 1011–1021, 2014.
- [13] A. Verissimo, G. Marrao, F. G. Da Silva, e M. S. Da Costa, «Distribution of *Legionella* spp. in hydrothermal areas in continental Portugal and the island of Sao Miguel, Azores», *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 57, n. 10, pp. 2921–2927, 1991.
- [14] P. Hoffman, H. Friedman, e M. Bendinelli, *Legionella Pneumophila: Pathogenesis and Immunity*, 22.^a ed. New York: Springer US, 2007.
- [15] D. W. Fraser *et al.*, «Legionnaires' Disease», *N. Engl. J. Med.*, vol. 297, n. 22, pp. 1189–1197, 1977.
- [16] I. S. Franco, H. A. Shuman, e X. Charpentier, «The perplexing functions and surprising origins of *Legionella pneumophila* type IV secretion effectors», *Cell. Microbiol.*, vol. 11, n. 10, pp. 1435–1443, 2009.
- [17] H. Hilbi e A. Haas, «Secretive Bacterial Pathogens and the Secretory Pathway», *Traffic*, vol. 13, n. 9, pp. 1187–1197, 2012.
- [18] N. Personnic, K. Bärlocher, I. Finsel, e H. Hilbi, «Subversion of Retrograde Trafficking by Translocated Pathogen Effectors», *Trends Microbiol.*, vol. 24, n. 6, pp. 450–462, 2016.
- [19] S. P. Salcedo e D. W. Holden, «Bacterial interactions with the eukaryotic secretory pathway», *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 8, n. 1, pp. 92–98, 2005.
- [20] M. Kousi, «Dissection of the Genetic Background of Childhood Onset Progressive Myoclonic Epilepsies», Universidade de Helsinki, 2011.
- [21] C. C. Scott, F. Vacca, e J. Gruenberg, «Endosome maturation, transport and functions», *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 31, pp. 2–10, 2014.

- [22] Y.-B. Hu, E. B. Dammer, R.-J. Ren, e G. Wang, «The endosomal-lysosomal system: from acidification and cargo sorting to neurodegeneration», *Transl. Neurodegener.*, vol. 4, n. 1, p. 18, Dez. 2015.
- [23] G. Li e M. C. Marlin, «Rab Family of GTPases», em *Methods in Molecular Biology*, New York, NY: Humana Press, 2015, pp. 1–15.
- [24] Y. Zhen e H. Stenmark, «Cellular functions of Rab GTPases at a glance», *J. Cell Sci.*, vol. 128, n. 17, pp. 3171–3176, 2015.
- [25] A. Wandinger-Ness e M. Zerial, «Rab proteins and the compartmentalization of the endosomal system.», *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 6, n. 11, pp. 1–25, Out. 2014.
- [26] V. M. Olkkonen e H. Stenmark, «The Rab GTPases family», *Genome Biol.*, vol. 2, n. 5, pp. 1–85, 2001.
- [27] J. Huotari e A. Helenius, «Endosome maturation», *EMBO J.*, vol. 30, n. 17, pp. 3481–3500, 2011.
- [28] B. Alberts, A. Johnson, e J. Lewis, «Pathogens, Infection, and Innate Immunity», em *Molecular Biology of the Cell.*, 4th ed., New York: Garland Science, 2002.
- [29] M. E. M. Pareja e M. I. Colombo, «Autophagic clearance of bacterial pathogens: molecular recognition of intracellular microorganisms.», *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, vol. 3, p. 54, 2013.
- [30] L. Xu e Z.-Q. Luo, «Cell biology of infection by *Legionella pneumophila*», *Microbes Infect.*, vol. 15, n. 2, pp. 157–167, Fev. 2013.
- [31] I. Finsel e H. Hilbi, «Formation of a pathogen vacuole according to *Legionella pneumophila*: How to kill one bird with many stones», *Cell. Microbiol.*, vol. 17, n. 7, pp. 935–950, 2015.
- [32] R. R. Isberg, T. J. O'Connor, e M. Heidtman, «The *Legionella pneumophila* replication vacuole: Making a cosy niche inside host cells», *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 7, n. 1, pp. 13–24, 2009.
- [33] C. K. Barlowe e E. A. Miller, «Secretory protein biogenesis and traffic in the early secretory pathway.», *Genetics*, vol. 193, n. 2, pp. 383–410, Fev. 2013.
- [34] D. a Fletcher e R. D. Mullins, «Cell mechanisms and cytoskeleton», *Nature*, vol. 463, n. 7280, pp. 485–492, 2010.
- [35] H. Lodish, A. Berk, e S. Zipursky, «The Dynamics of Actin Assembly», em *Molecular Cell Biology*, 4th ed., New York: W. H. Freeman and Company, 2000, p. Section 18.2.
- [36] G. Cooper, «Structure and Organization of Actin Filaments.», em *The Cell: A Molecular Approach*, 2nd ed., Sunderland (MA): Sinauer Associates, 2000.
- [37] J. N. Bugalhão, L. J. Mota, e I. S. Franco, «Bacterial nucleators: Actin' on actin», *Pathog. Dis.*, vol. 73, n. 9, pp. 1–11, 2015.
- [38] O. Steele-Mortimer, L. A. Knodler, e B. Brett Finlay, «Poisons, ruffles and Rockets: Bacterial Pathogens and the host cell cytoskeleton», *Traffic*, vol. 1, n. 2, pp. 107–118, 2000.
- [39] M. M. Weber e R. Faris, «Subversion of the Endocytic and Secretory Pathways by Bacterial Effector Proteins», *Front. Cell Dev. Biol.*, vol. 6, n. 1, pp. 1–17, Jan. 2018.
- [40] H. Nagai e T. Kubori, «Type IVB Secretion Systems of *Legionella* and Other Gram-Negative Bacteria», *Front. Microbiol.*, vol. 2, n. 136, pp. 1–12, 2011.
- [41] H. J. Newton, D. K. Y. Ang, I. R. Van Driel, e E. L. Hartland, «Molecular pathogenesis of infections caused by *Legionella pneumophila*», *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 23, n. 2, pp. 274–298, 2010.
- [42] C. Michard e P. Doublet, «Post-translational modifications are key players of the *Legionella pneumophila* infection strategy», *Front. Microbiol.*, vol. 6, n. 87, pp. 1–12, Fev. 2015.
- [43] N. Shohdy, J. A. Efe, S. D. Emr, e H. A. Shuman, «Pathogen effector protein screening in yeast identifies *Legionella* factors that interfere with membrane trafficking», *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, n. 13, pp. 4866–4871, 2005.
- [44] J. N. Bugalhão, L. J. Mota, e I. S. Franco, «Identification of regions within the *Legionella pneumophila* VipA effector protein involved in actin binding and polymerization and in interference with eukaryotic

- organelle trafficking», *Microbiol. Open*, vol. 5, n. 1, pp. 118–133, 2016.
- [45] I. S. Franco, N. Shohdy, e H. A. Shuman, «The Legionella pneumophila effector VipA is an actin nucleator that alters host cell organelle trafficking», *PLoS Pathog.*, vol. 8, n. 2, 2012.
 - [46] R. K. Sherwood e C. R. Roy, «A Rab-centric perspective of bacterial pathogen-occupied vacuoles», *Cell Host Microbe*, vol. 14, n. 3, p. 24, 2013.
 - [47] J. D. Pardee e J. A. Spudich, «Purification of Muscle Actin», em *Methods in Cell Biology*, Elsevier Inc., 1982, pp. 271–289.
 - [48] S. Christoforidis e M. Zerial, «Purification and identification of novel rab effectors using affinity chromatography», *Methods*, vol. 20, n. 4, pp. 403–410, 2000.
 - [49] A. T. C. Carvalho, «The mechanism of the Legionella VipA protein in altering actin dynamics during infection», Universidade Nova de Lisboa, 2019.
 - [50] S. Wang, D. Wang, D. Du, S. Li, e W. Yan, «Advances in the Assembly Model of Bacterial Type IVB Secretion Systems», *Appl. Sci.*, vol. 8, n. 12, p. 2368, Nov. 2018.
 - [51] S. Banga *et al.*, «Legionella pneumophila inhibits macrophage apoptosis by targeting pro-death members of the Bcl2 protein family», *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 104, n. 12, pp. 5121–5126, 2007.
 - [52] H. J. Newton *et al.*, «Significant role for ladC in initiation of Legionella pneumophila infection», *Infect. Immun.*, vol. 76, n. 7, pp. 3075–3085, 2008.
 - [53] J. A. Sexton, J. L. Miller, A. Yoneda, T. E. Kehl-Fie, e J. P. Vogel, «Legionella pneumophila dotU and icmF are required for stability of the Dot/Icm complex», *Infect. Immun.*, vol. 72, n. 10, pp. 5983–5992, 2004.
 - [54] A. Prashar *et al.*, «Small Rho GTPases and the effector VipA mediate the invasion of epithelial cells by filamentous Legionella pneumophila», *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, vol. 8, n. 133, pp. 1–19, 2018.
 - [55] I. S. Anand, W. Choi, e R. R. Isberg, «Components of the endocytic and recycling trafficking pathways interfere with the integrity of the Legionella-containing vacuole», *Cell. Microbiol.*, vol. 22, n. 4, pp. 1–16, 2020.
 - [56] C. Michard *et al.*, «The Legionella Kinase LegK2 Targets the ARP2/3 Complex To Inhibit Actin Nucleation on Phagosomes and Allow Bacterial Evasion of the Late Endocytic Pathway», *MBio*, vol. 6, n. 3, pp. 1–14, 2015.
 - [57] T. Kubori e H. Nagai, «Bacterial effector-involved temporal and spatial regulation by hijack of the host ubiquitin pathway», *Front. Microbiol.*, vol. 2, n. 145, pp. 1–7, 2011.
 - [58] S. Kühn *et al.*, «Actin Assembly around the Shigella-Containing Vacuole Promotes Successful Infection», *Cell Rep.*, vol. 31, n. 6, 2020.
 - [59] L. Caven e R. A. Carabeo, «Pathogenic puppetry: Manipulation of the host actin cytoskeleton by Chlamydia trachomatis», *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, n. 1, pp. 1–21, 2020.
 - [60] E. Ohashi, K. Tanabe, Y. Henmi, K. Mesaki, Y. Kobayashi, e K. Takei, «Receptor Sorting within Endosomal Trafficking Pathway is Facilitated by Dynamic Actin Filaments», *PLoS One*, vol. 6, n. 5, 2011.

Anexos

Tabela A1– Composição das soluções/reagentes usados neste trabalho.

Soluções/Reagentes	Composição
Meio de crescimento LB (1 L)	25 g de LB <i>broth</i> (NZYtech); Perfazer volume com dH ₂ O até 1 L; Autoclavar
Meio de autoindução (1 L): LB; solução de 5052; solução de NPS; 1 mM de MgSO ₄	1000 mL de LB; 20 mL da solução 50x 5052; 50 mL da solução 20x NPS; 1 mL de 100 mg/mL ampicilina; 1 mL de 1 M MgSO ₄
Meio de cultura RPMI-1640 (500 mL): 10% FBS; 10 mM de HEPES; 1% L-glutamina; 1 mM de piruvato de sódio; 57,2 µM de β-mercaptoetanol	50 mL de FBS; 5 mL de (1 M) de HEPES; 5 mL de (200 mM) de glutamina; 5 mL de (100 mM) piruvato de sódio; 2 µL de 14,3 M β-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich)
Meio de crescimento AYE (200 mL)	2 g de ACES (Amresco); 2 g de Extrato de levedura (Scharlau); 0,08 g de L-cisteína HCl.H ₂ O (Sigma-Aldrich) 100 mL de dH ₂ O e agitar; 0,034 g de sulfato de ferro II (FeSO ₄) (Merck); Acertar pH para 6,9 com 10N de KOH; Perfazer volume com dH ₂ O até 200 mL; Filtrar com um filtro de 0,2 µm
Meio LA	3g de Bacto Agar; 5 g de LB <i>broth</i> ; Perfazer volume com dH ₂ O até 200 mL; Autoclavar;
Meio CYE	5 g de ACES (Amresco); 5 g de Extrato de levedura (Scharlau); 450 mL de dH ₂ O; Acertar pH para 6,9 com 10N de KOH; Perfazer volume com dH ₂ O até 500 mL; 7,5 g de bacto agar (Sigma-Aldrich); 1 g de carvão ativado (Sigma-Aldrich); Autoclavar; 5 mL de L-cisteína; 5 mL de nitrato de ferro (FeNO ₃);
Stock de 34 mg/mL de Cloranfenicol (100 mL)	34 mg de cloranfenicol Perfazer volume com 95% de etanol Filtrar
Stock de 100 mg/mL de Ampicilina (100 mL)	100 mg de ampicilina Perfazer volume com dH ₂ O até 100 mL Filtrar
Gel de Resolução 12% (2 géis) (15 mL)	6,5 mL de dH ₂ O 3,8 mL de 1,5 M Tris pH 8,8 75 µL de 20% SDS 4,5 mL de 40% acrilamida (NZYTech) 150 µL de 10% APS 6 µL de TEMED (Amresco)
Gel de Concentração 5% (2 géis) (10 mL)	7,4 mL de dH ₂ O 1,25 mL de 1 M Tris pH 6,8 50 µL de 20% SDS

	1,25 mL de 40% acrilamida (NZYTech) 100 µL de 10% APS 10 µL de TEMED (Amresco)
Solução de 50x 5052: 2,5% de glucose (p/v); 25% de glicerol (p/v); 10% de lactose (p/v)	2,5% (p/v) de Glucose (Roth) 25% (p/v) de glicerol (VWR Chemicals) 10% (p/v) de lactose (Sigma Aldrich) Perfazer o volume com dH ₂ O
Solução de 20x NPS (500 mL)	33 g de (NH ₄)SO ₄ (Merck); 68 g de KH ₂ PO ₄ (Merck); 71 g de NaH ₂ PO ₄ (Amresco); Perfazer volume com dH ₂ O até 500 mL; Autoclavar
Solução de 4 M imidazole pH 8 (50 mL)	13,6 g de imidazole (Merck); Acertar pH para 8; Perfazer volume com dH ₂ O até 50 mL
Solução de 0,4 M HEPES pH 7,5 (235 mL)	23,8 g de HEPES (Sigma-Aldrich); Perfazer com dH ₂ O; Autoclavar
Solução de 200 mM MgCl ₂ (200 mL)	8,12 g de MgCl ₂ .6H ₂ O (Scharlau); Perfazer com dH ₂ O; Autoclavar
Solução 5x <i>loading buffer</i> para SDS-PAGE	0,25 M Tris-HCl pH 6,8; 10% (p/v) SDS; 50% (v/v) Glicerol; 0,5 M β-mercaptoetanol; 0,5% azul de bromofenol; Perfazer com dH ₂ O até volume desejado
Solução de <i>staining</i> de Comassie (1 L)	400 mL metanol; 70 mL de ácido acético glacial; 2 g de Comassie azul brilhante R-20 (Amresco); Perfazer volume com dH ₂ O até 1L
Solução de <i>destaining</i> (1 L)	400 mL de metanol; 70 mL de ácido acético glacial
Solução 10% (p/v) APS (10 mL)	1 g de persulfato de amônia (APS) (Roth); Perfazer volume com dH ₂ O até 10 mL
Solução 20% (p/v) SDS (500 mL)	100 g de SDS (NZYTech); Perfazer volume com dH ₂ O até 500 mL
Solução 10x PBS (2 L)	160,12 g de NaCl (VWR chemicals); 4,02 g de KCl (Scharlau); 71,63 g de NaH ₂ PO ₄ (Amresco); 5,56 g de KH ₂ PO ₄ (Merck); 1800 mL de dH ₂ O; Acertar pH para 7,4; Perfazer volume com dH ₂ O até 2 L; Autoclavar
Solução de Tris-Glicina 10x (1 L)	30,3 g de Tris (NZYTech); 144 g de Glicina (NZYTech) Perfazer volume com dH ₂ O até 1 L; Autoclavar
Solução de PBSS (100 mL): PBS; 0,1% (p/v) saponina	0,1 g de saponina (VWR Chemicals); 100 mL de PBS
Tampão de fosfato de sódio pH 8 (2 L): 50 mM de NaH ₂ PO ₄ ; 300 mM de NaCl	12 g de NaH ₂ PO ₄ (Amresco); 35,1 g de NaCl (VWR Chemicals); Acertar pH para 8;

	Perfazer volume com dH ₂ O até 2 L; Filtrar a vácuo
Tampão de lise pH 8 (500 mL): 50 mM de NaH ₂ PO ₄ ; 300 mM de NaCl; 20 mM de imidazole	450 mL do tampão fosfato de sódio pH 8; 2,5 mL de 4 M imidazole; Acertar o pH para 8; Perfazer volume com tampão fosfato de sódio pH 8 até 500 mL; Filtrar a vácuo
Tampão de lavagem pH 8 (500 mL): 50 mM de NaH ₂ PO ₄ ; 300 mM de NaCl; 40 mM de imidazole	450 mL do tampão fosfato de sódio pH 8; 5 mL de 4 M imidazole; Acertar o pH para 8; Perfazer volume com tampão fosfato de sódio pH 8 até 500 mL; Filtrar a vácuo
Tampão de eluição 100 mM pH 8 (100 mL): 50 mM de NaH ₂ PO ₄ ; 300 mM de NaCl; 100 mM de imidazole	80 mL do tampão fosfato de sódio pH 8; 2,5 mL de 4 M imidazole; Acertar o pH para 8; Perfazer volume com tampão fosfato de sódio pH 8 até 100 mL; Filtrar a vácuo
Tampão de eluição 200 mM pH 8 (100 mL): 50 mM de NaH ₂ PO ₄ ; 300 mM de NaCl; 200 mM de imidazole	80 mL do tampão fosfato de sódio pH 8; 5 mL de 4 M imidazole; Acertar o pH para 8; Perfazer volume com tampão fosfato de sódio pH 8 até 100 mL; Filtrar a vácuo
Tampão de eluição 300 mM pH 8 (100 mL): 50 mM de NaH ₂ PO ₄ ; 300 mM de NaCl; 300 mM de imidazole	80 mL do tampão fosfato de sódio pH 8; 7,5 mL de 4 M imidazole; Acertar o pH para 8; Perfazer volume com tampão fosfato de sódio pH 8 até 100 mL; Filtrar a vácuo
Tampão de eluição 500 mM pH 8 (100 mL): 50 mM de NaH ₂ PO ₄ ; 300 mM de NaCl; 500 mM de imidazole	80 mL do tampão fosfato de sódio pH 8; 12,5 mL de 4 M imidazole; Acertar o pH para 8; Perfazer volume com tampão fosfato de sódio pH 8 até 100 mL; Filtrar a vácuo
Tampão de PBS pH 7,4 (1 L)	10 mL de 10x de PBS; Perfazer volume com dH ₂ O até 1000 mL
Tampão de PBS com 10 mM glutatona pH 7,4 (30 mL)	0,09 g de L-glutatona reduzida (Sigma-Aldrich); Perfazer volume com PBS até 30 mL
Tampão 1 M Tris-HCL pH 8 (500 mL)	60,6 g de Tris (NZYTech) 350 mL de dH ₂ O; Acertar pH para 8; Perfazer volume com dH ₂ O até 500 mL; Autoclavar
Tampão de G-Mg para diálise pH 8 (2 L): 5 mM Tris-HCl pH 8; 0,1 mM MgCl ₂	10 mL de 1 M Tris-HCl pH 8; 1 mL de 200 mM MgCl ₂ ; Perfazer volume com dH ₂ O até 2 L
Tampão de G-Mg para ensaios de actina-pireno pH 8 (50 mL): 5 mM Tris-HCl pH 8; 0,1 mM MgCl ₂	10 mL de 1 M Tris-HCl pH 8; 1 mL de 200 mM MgCl ₂ ; Perfazer volume com dH ₂ O até 50 mL;

	Filtrar com seringa com filtro de 25 mm com 0,2 µm de celulose (VWR international)
Tampão Geral de actina ou G-actina (50 mL): 5 mM Tris-HCl; 0,2 mM CaCl ₂	250 µL de 1 M Tris-HCl pH 8; 10 µL de 1 M CaCl ₂ ; Perfazer volume com dH ₂ O até 50 mL; Filtrar com seringa com filtro de 25 mm com 0,2 µm de celulose (VWR international)
Tampão de 10x 10E/1M (50 mL): 2 mM de EGTA; 0,5 mM de MgCl ₂	1 mL de 0,1 M EGTA; 0,125 mL de 200 mM MgCl ₂ ; Perfazer volume com dH ₂ O até 50 mL; Filtrar com seringa com filtro de 25 mm com 0,2 µm de celulose (VWR international)
Tampão de 10x KMEI (50 mL): 100 mM de imidazole; 500 mM de KCl; 10 mM de MgCl ₂ ; 10 mM de EGTA	1,25 mL de 4 M imidazole; 8,3 mL de 3 M KCl; 2,5 mL de 200 mM MgCl ₂ ; 5 mL de 0,1 M EGTA; Perfazer com dH ₂ O até 50 mL; Filtrar com seringa com filtro de 25 mm com 0,2 µm de celulose (VWR international)
Tampão 1,5 M Tris pH 8,8 (1 L)	181,7 g Tris (NZYTech); 800 mL de dH ₂ O; Acertar pH até 8,8; Perfazer volume com dH ₂ O até 1 L; Autoclavar
Tampão 1 M Tris pH 6,8 (1 L)	121,1 g Tris (NZYTech); 800 mL de dH ₂ O; Acertar pH até 6,8; Perfazer volume com dH ₂ O até 1 L; Autoclavar
Tampão de corrida Tris-Glicina (10 L)	1 L de 10x Tris-Glicina; 50 mL de 20% SDS; Perfazer volume com dH ₂ O até 10 L
Tampão de Transferência 1x (1 L)	100 mL de 10x Tampão de transferência 200 mL de metanol 700 mL de dH ₂ O
PBS tween: PBS; 0,2 % (v/v) tween (1 L)	100 mL de 10x PBS 2 mL de Tween (Amresco) 900 mL de dH ₂ O
Leite: PBS Tween; 4 % (p/v) leite em pó (50 mL)	50 mL de PBS tween 2 g de leite em pó

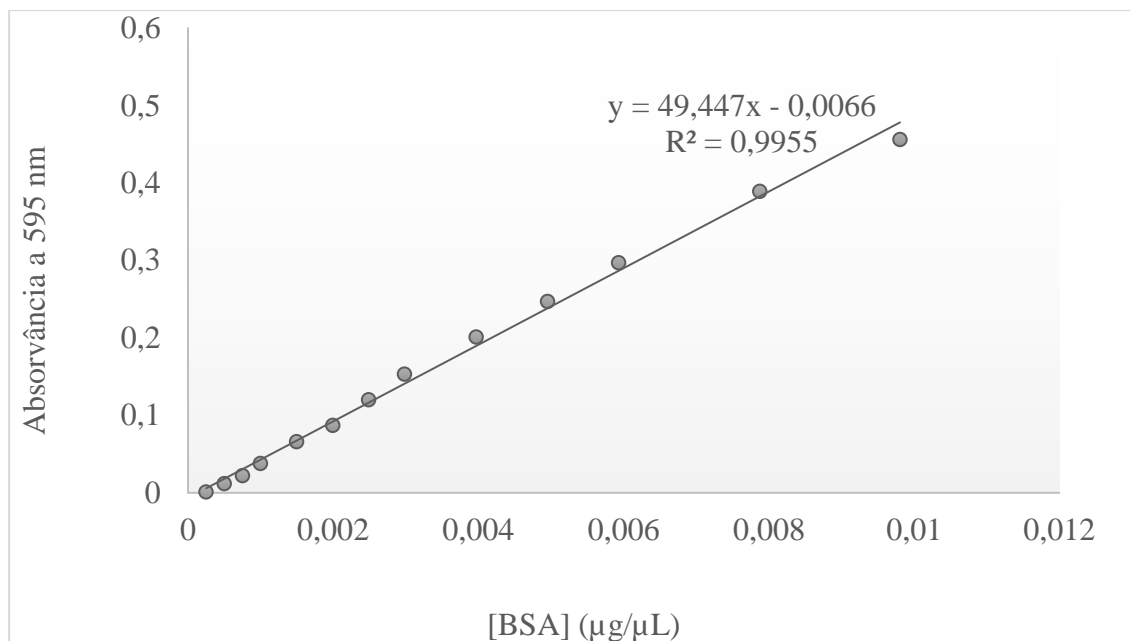


Figura A1- Ensaio de Bradford para quantificação total de proteína. A concentração de proteína foi calculada através da construção de uma reta de calibração e subsequente determinação da equação de reta.

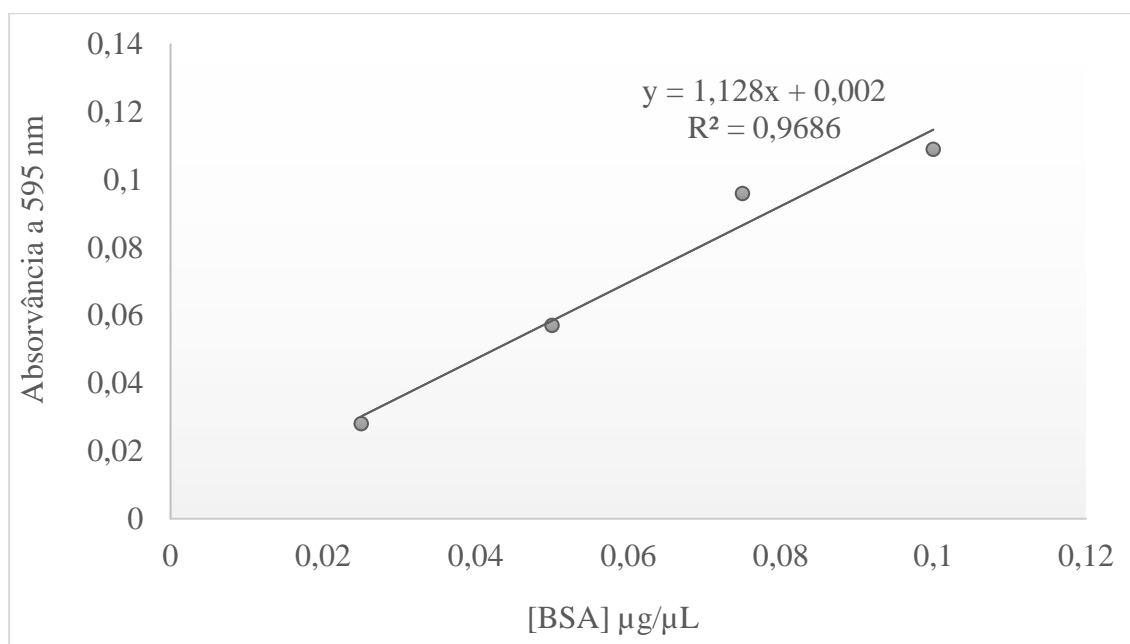


Figura A2 – Ensaio de Bradford para quantificação total de actina e pireno-actina. A concentração de proteína foi calculada através da construção de uma reta de calibração e subsequente determinação da equação de reta.

$$SEM = \frac{\text{Desvio padrão das Médias}}{\sqrt{n}}$$

Figura A3 - Fórmula para o cálculo do erro padrão da média (SEM). n indica o número de ensaios realizados.

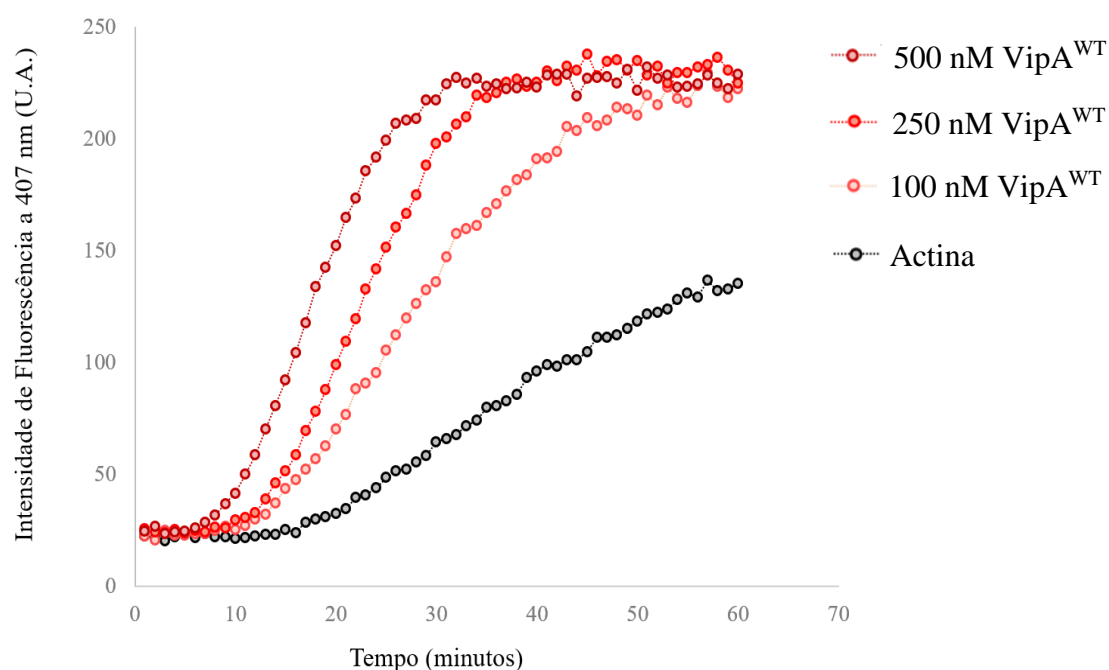


Figura A4 – His₆-VipA^{WT} exacerba a polimerização de actina. Ensaios de polimerização de actina, *in vitro*, foram realizados na presença de 2,4 μM de actina monomérica (20% de pireno-actina) e His₆-VipA^{WT} a diferentes concentrações (100, 250 e 500 nM). Os valores de fluorescência (expressos em Unidades Arbitrárias, U.A.) foram recolhidos a 407 nm após a excitação a 365 nm e medidos após a indução de polimerização (a *t* = 5 min). As curvas apresentadas são imagens representativas.

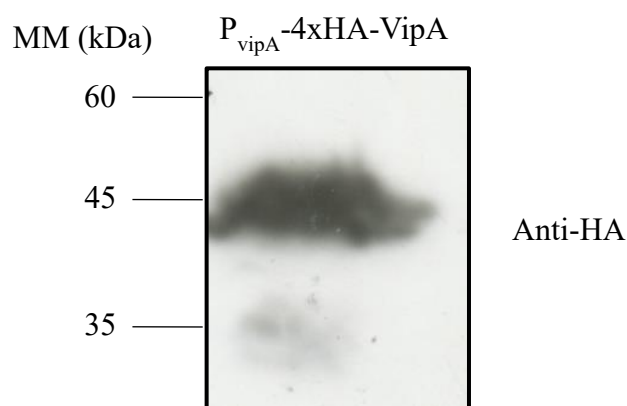
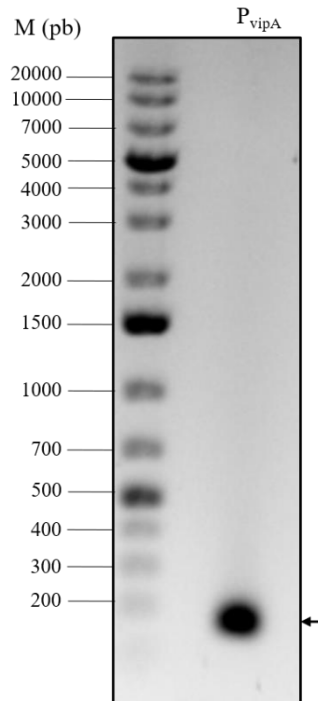
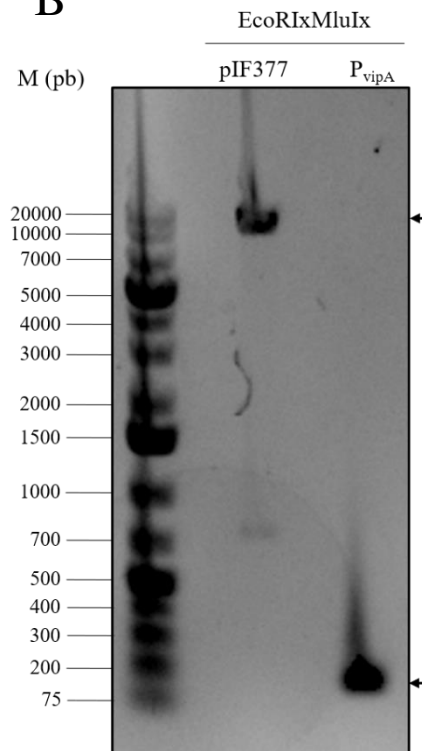


Figura A5 - Expressão de 4xHA-VipA (42,6 kDa) na estirpe LPJS1. 750 μL da cultura da estirpe LPJS1 foram centrifugados, e o *pellet* recolhido, ressuspensionado em 100 μL de SDS LB e congelado a -20 °C. A análise foi realizada por *immunoblot* através do anticorpo primário anti-HA e respetivo anticorpo secundário conjugado a HRP. MM, massa molecular.

A



B



C

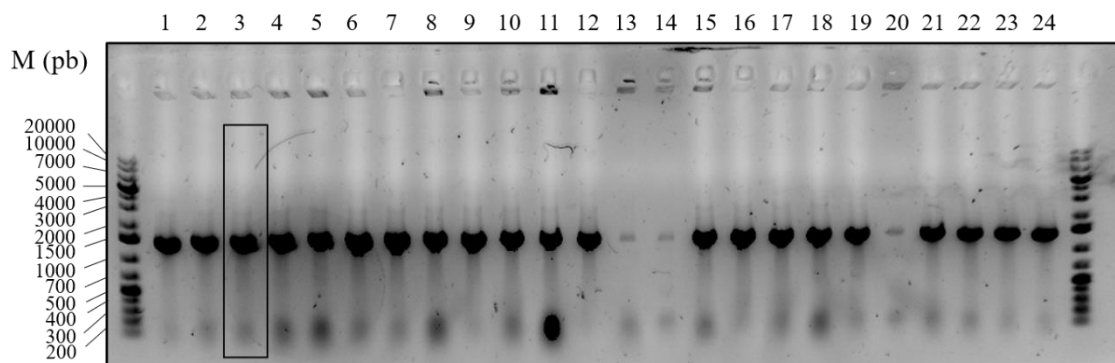


Figura A6 - Construção do plasmídeo pJS1 (P_{vipA} -4xHA-VipA). (A) Amplificação do promotor natural de *L. pneumophila* que controla a expressão de VipA, a partir da estirpe JR32 (WT), recorrendo aos *primers* forward 2674 e reverse 2675. O produto de PCR foi corrido em gel de agarose 1%, 100 V, durante 25 minutos. (B) As reações de digestão do promotor amplificado e do plasmídeo pIF377 foram realizadas recorrendo às enzimas MluI e EcoRI, sendo o produto de cada digestão purificado e corrido em gel de agarose 1%, durante 15 minutos a 100 V. (C) *Colony* PCR de 24 colónias escolhidas ao acaso de forma a selecionar clones positivos. Os produtos PCR, de cada colónia, foram corridos em gel agarose 1%, durante 15 minutos a 100 V. O clone 3, selecionado para propagação, encontra-se marcado com um retângulo. Bandas correspondentes ao (A) promotor amplificado (171 pb), e (B) ao plasmídeo pIF377 (10000 pb) e promotor (151 pb) digeridos, encontram-se assinaladas com setas.